UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER
U.E.R. de Sciences Pharmaceutiques
TOULOUSE **N° 235**

RECHERCHES PHARMACOGNOSIQUES sur AQUILEGIA NEMORALIS (J) et sur AQUILEGIA PYRENAICA (D. C)

THÈSE

pour le doctorat de l'Université
Mention Pharmacie

présentée et soutenue publiquement en février 1971

par

Bernard DAGEN
Pharmacien

Membres du jury

M.	E. STANISLAS	*Président*
Mmes	D. CAUJOLLE	*Assesseurs*
	S. LASCOMBES	
MM.	R. ROUFFIAC	
	J. CROS	*Suppléant*

CEPADUES
29, boul. Carnot, 29
TOULOUSE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536520_0024

UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER
U.E.R. de Sciences Pharmaceutiques
TOULOUSE **N° 235**

RECHERCHES PHARMACOGNOSIQUES sur AQUILEGIA NEMORALIS (J) et sur AQUILEGIA PYRENAICA (D. C)

THÈSE

pour le doctorat de l'Université
Mention Pharmacie

présentée et soutenue publiquement en février 1971

par

Bernard DAGEN
Pharmacien

Membres du jury

M.	E. STANISLAS	*Président*
Mmes	D. CAUJOLLE	*Assesseurs*
	S. LASCOMBES	
MM.	R. ROUFFIAC	
	J. CROS	*Suppléant*

CEPADUES
29, boul. Carnot, 29
TOULOUSE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE PAUL SABATIER

118, Route de Narbonne

31 - TOULOUSE

-:-:-:-

TABLEAU DU PERSONNEL

UNITE PHARMACEUTIQUE

Président de l'Université : Monsieur LARENG
1er Vice-Président : Monsieur MATHIS
Directeur de l'Unité : Monsieur BREUILLAUD
Doyens honoraires : Messieurs LAZOTHES, BRUSTIER
Professeurs honoraires : Messieurs DELAS, VINCENT, DULUCQ

Botanique et Cryptogamie	MM.	N.....
Chimie Analytique		PITET
Toxicologie, Hygiène industrielle et Hydrologie		BOURBON
Chimie pharmaceutique		BLANC
Microbiologie		BREUILLAUD
Pharmacie chimique et Pharmacodynamie		CAUJOLLE
Pharmacie galénique et Matière médicale		STANISLAS
Physiologie, Zoologie et Parasitologie pharmaceutique		ROUX

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie	MM.	COUTURIER
Sciences Naturelles	Mme.	CAUJOLLE
Toxicologie		BROUSSY G.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

- Chimie organique	MM. BERTRAND
- Zoologie	GAYREL

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

- Botanique	Mme. LASCOMBES
- Microbiologie	MM. MICHEL
- Pharmacodynamie	CROS
- Physiologie	DUMAS
- Pharmacie galénique	ROUFFIAC
- Chimie biologique	SOULA
- Toxicologie	MALBOSC

Secrétaire Général de l'Université : Monsieur PRINEAU J.P.

L'Université déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.

ooooo0 ooooo

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A NOTRE JURY DE THESE

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR E. STANISLAS
Professeur de Pharmacie Galénique et de Matière Médicale.

Poursuivant nos recherches dans son service il nous a constamment prodigué ses conseils éclairés et précis. Nous tenons à lui exprimer notre respectueuse reconnaissance pour la bienveillance qu'il n'a cessé de nous témoigner.

A NOTRE MAITRE MADAME LE PROFESSEUR S. LASCOMBES
Maître de Conférences Agrégé de Botanique
et de Cryptogamie.

Madame le Professeur S. LASCOMBES nous a proposé ce travail de recherche. Qu'elle nous permette de lui exprimer ici, nos sentiments les plus respectueux et reconnaissants pour toute l'aide qu'elle nous a généreusement dispensée dans la conduite de cette étude et l'intérêt dont elle a toujours fait preuve à l'égard de nos recherches et de nous même.

MADAME LE PROFESSEUR D. CAUJOLLE
Professeur de Sciences Naturelles.

Sans son appui nous n'aurions pu mener à bien les travaux d'ordre physiologique pour lesquels elle nous a judicieusement conseillé.
Nous lui renouvelons l'expression de notre profonde gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. ROUFFIAC

Maître de Conférences Agrégé de
Pharmacie Galénique.

Il nous a fait profiter avec son amabilité coutumière de sa grande expérience.
Nous le prions de croire à notre profonde reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. CROS

Maître de Conférences Agrégé de
Pharmacodynamie.

Nous le remercions d'avoir bien voulu faire partie de notre jury de thèse et de nous avoir donné, dans sa spécialité, son aide et ses conseils.

MADAME LE PROFESSEUR HONORAIRE TH. DULUCQ-MATHOU

Elle nous a accueilli dans son service
au cours de nos études de Pharmacie,
nous a guidé et conseillé.
Nous lui témoignons, ici, notre attachement profond et sincère.

A TOUS MES MAITRES

DE L'U. E. R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

DE TOULOUSE

Avant d'aborder l'exposé de nos recherches, nous tenons à exprimer nos remerciements à tous ceux qui ont bien voulu nous conseiller ou nous aider dans la réalisation de notre projet :

- Madame OUSTRIN, Docteur en Pharmacie, dont l'appui nous a été précieux pour l'illustration de notre document.

- Monsieur R. CAUJOLLE, Maître assistant de Pharmacie Chimique, pour tout le soutien qu'il nous a apporté dans le domaine de la spectrographie infra-rouge.

- Monsieur GRACIS, pour son concours efficace.

- Les membres du Service de Botanique et ceux du Service de Pharmacie Galénique et de Matière Médicale dont le dévouement fut constant.

AVANT PROPOS

Les Ancolies sont, par leur beauté, connues depuis des temps très anciens. Les poètes du Moyen Age les ont citées : FROISSART "*Et là, plusieurs aiment moult l'anquelie...*" Eustache DESCHAMPS, dans une ballade, cite : "*la violette donne aussi douce odeur, si fait la soussie, la marguerite, l'angorie...*" Au 16° siècle RONSARD écrivait encore : "*et l'ancolie en semance s'enflant...*" tandis que trois siècles plus tard BARTHELEMY faisant de l'ancolie le symbole de la tristesse, décrivait : "*Nadur, jeune vieillard, poète de la prose qui même sur son front l'ancolie à la rose...*" Même SHAKESPEARE fait allusion dans HAMLET à : "*the blue cornutted columbine*".

Enfin, nous ne saurions oublier qu'en Languedoc, pays des "Mainteneurs de la gaye science", l'ancolie a figuré, jusqu'en 1694, dans le sceau des jeux floraux, au lieu et place de l'Eglantine.

Si donc, la beauté de l'Ancolie a ému nos

poètes, elle n'en est pas moins connue depuis l'Antiquité comme un simple remarquable.

DIOSCORIDE préconisa ses semences contre la toux, et les affections de poitrine, suivi dans ce sens par GALIEN. TRAGUS utilisa les racines, non seulement contre les maux de poitrine, mais aussi contre les convulsions.

CAMERARIUS pensait, tout comme DRAGENDORFF (3), que la racine favorisait l'élimination des calculs reinaux et soulageait les ictériques.

Il faut ensuite attendre la fin du 18e siècle pour entendre reparler de la valeur thérapeutique des Ancolies : CHAUMETON usa des graines en art vétérinaire.

Aquilegia vulgaris devait entrer dans la PHARMACOPEE de 1818.

C'est avec LINNE et CAZIN (2) que l'on rencontre pour la première fois la notion de toxicité :

"Semine expellunt variolas, scabium infantum tolluunt sed nemiam dosin ab aniculis prescriptum infantum occidere vidi".

En 1923 le Docteur REUTTER (20), dans son traité de matière médicale et de chimie végétale, mentionne les fleurs et les graines comme étant utilisées en médecine populaire (effet sédatif et diurétique). Lui aussi parle de leur toxicité, qu'il attribue à un glucoside mal déterminé.

Jusqu'à nos jours cette plante n'a été que peu étudiée : A.T de ROCHEBRUNE (21) isola le premier, des semences de l'Ancolie, un alcaloïde : l'aquilegine, dont il mentionne la toxicité dans son livre "Toxicologie Africaine".

Ces dernières années, quelques travaux, en provenance des USA, (28) indiquaient la présence d'alcaloïdes dans de nombreuses espèces d'Ancolies américaines.

Il nous a donc paru intéressant, après une étude anatomique, de préciser la composition alcaloïdique et la toxicité de diverses Ancolies pyrénéennes.

Nos recherches ont porté sur deux espèces :

- *Aquilegia nemoralis (Jordan)*
- *Aquilegia pyrenaica (De Candolle)*

PLAN

PREMIERE PARTIE : ETUDE BOTANIQUE

Position systématique :

Chapitre I - Etude de *Aquilegia nemoralis* (Jordan)

1) Répartition et habitat

2) Morphologie externe

3) Anatomie

Chapitre II- Etude de *Aquilegia pyrenaica* (De Candolle)

1) Répartition et habitat

2) Morphologie externe

3) Anatomie

Conclusion

DEUXIEME PARTIE : RECHERCHE DES ALCALOIDES

Travaux antérieurs :

Chapitre I - Etude des alcaloïdes de *Aquilegia nemoralis*.

1) Choix et préparation du matériel
2) Obtention de l'extrait alcaloïdique
   a - Pharmacopée de Genève
   b - Lixiviation
3) Séparation des alcaloïdes
   a - Procédé de STASS
   b - Méthode des reineckates
4) Fragmentation des blocs alcaloïdiques A et B
   a - par chromatographie sur papier
   b - par chromatographie sur colonne
   c - par chromatographie sur couche mince
   d - obtention des alcaloïdes à l'état cristallisé.

5) Identification des alcaloïdes cristallisés

a - par chromatographie sur papier

b - spectrographie UV

c - spectrographie IR

Conclusion

Chapitre II - Etude des alcaloïdes de *Aquilegia pyrenaica*

1) Obtention de l'extrait alcaloïdique

2) Séparation des alcaloïdes par chromatographie sur couche mince et caractérisation par chromatographie sur papier

Conclusion

TROISIEME PARTIE : ESSAIS TOXICOLOGIQUES
ET PHARMACODYNAMIQUES

Chapitre I - Etude de la toxicité immédiate et différée

1) A l'égard de la souris

a - par voie intra-péritonéale

b - par voie intra-veineuse

c - par voie orale.

2) A l'égard du rat

Examens anatomopathologiques

Chapitre II- Essais pharmacodynamiques préliminaires

Conclusion

CONCLUSIONS GENERALES

PREMIERE PARTIE

ETUDE BOTANIQUE

POSITION SYSTEMATIQUE

Le genre Aquilegia fait partie des Dicotylédones, dialypétales, thalamiflores, ordre des Ranales ou Polycarpiques, famille des Renonculacées.

Les Ancolies renferment de très nombreuses espèces. P.A MUNZ, (17) dans "Gentes herbarum" répertorie à travers le monde 67 espèces. Comme lui, de nombreux botanistes ont, pendant plus d'un siècle, utilisé uniquement les caractères externes pour déterminer les espèces, sous espèces et variétés. C'est ainsi que seuls *A. Vulgaris* et *A.pyrenaica* furent considérés comme de véritables espèces par LAMARK et DE CANDOLLE, GODRA et GRENIER (1848) ZETTERSTEDT (1857), GILLET et MAGNE (1868).

Les autres espèces étaient plus ou moins discutées.

En 1870 TIMBAL - LAGRAVE élevait A. nemoralis au rang d'espèce alors que ROUY et FOUCAULT le ramenaient, en 1893, au rang de variété. Cette polémique se poursuivra pendant de nombreuses années jusqu'à ce que soit établi, sur des bases anatomiques, le critère, de la distinction des espèces. Pour Mademoiselle BORDERES, (1) *A. nemoralis*, considéré pendant longtemps comme une variété de *A. vulgaris*,

s'en distingue, non seulement par des particularités morphologiques mais aussi par des caractères anatomiques.

Il constitue donc, comme *A. pyrenaica* une véritable espèce.

Nous devons à cet auteur un important travail de révision des Ancolies des Pyrénées qui aboutit à la classification suivante :

A - Subscaposae	*A. pyrenaica (DC)*
	A. hirsutissema (Lapeyrouse et T.L)
B - Elatiores	*A. vulgaris (L)*
	A. nemoralis (Jordan)
	A. mollis (TL)
	A. viscosa (Gouan)

Cette classification est fondée sur la forme des feuilles caulinaires :

- feuilles caulinaires petites ou absentes, différant des radicales :
  A - Subscaposae.
- feuilles caulinaires semblables aux radicales, tiges hautes et feuillées :
  B - Elatiores.

Dans le premier groupe l'auteur considère *A.pyrenaica* comme le complément en haute montagne de *hirsutissima*.

Dans le deuxième groupe *nemoralis* et *vulgaris*, malgré de grandes ressemblances, montrent une individualité très nette.

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DE

AQUILEGIA NEMORALIS (Jordan)

1. REPARTITION ET HABITAT

Aquilegia nemoralis (J) se rencontre dans les lieux frais et humides des contreforts de la chaîne pyrénéenne, dans l'Aude, l'Ariège et jusque dans la Haute-Garonne. On trouve cette plante dans la forêt de Bouconne, près de Toulouse. Elle semblerait, d'après sa répartition pyrénéenne, avoir une origine médio-européenne.

2. MORPHOLOGIE EXTERNE

Moins largement répandu que *A. Vulgaris* (L), *A. nemoralis* (J) (7) est une belle espèce qui peut atteindre 1 mètre de haut.

La plante est vivace par un rhizome court, recouvert à sa partie supérieure par les gaines des anciennes feuilles. Un important système radiculaire lui fait suite. Le rhizome est renflé en tubercule ainsi que la base de la racine principale.

La tige aérienne est légèrement sillonnée et dépourvue de poils (différence avec *A. vulgaris*).

Les feuilles, vertes et glabres en dessus, sont glauques et toujours pubescentes en dessous. Elles sont nombreuses à la base de la tige ou elles s'insèrent par un long pétiole à peine pubescent, engainant à sa base. Leur

limbe est constitué par trois folioles pétiolulées, divisées en trois lobes. Ces lobes, pédicellés chez les feuilles basilaires, sont divisés par des sinus plus ou moins profonds, en lobules crénelés et cunéiformes.

Les feuilles caulinaires sont sessiles, trifoliolées , à lobes souvent entiers. Les fleurs (pl. I) d'un beau bleu, sont réunis en une panicule lâche. De taille moyenne, elles sont portées par des pédoncules longs et pubescents.

Le calice se compose de cinq pièces pétaloïdes ovales, longues de 18 millimètres terminées par un mucron.

La corolle est formée de cinq pétales à limbe tronqué, portant un éperon nectarifère légèrement recourbé en crochet, plus long que le reste des pétales. Dépassant peu les pétales, les étamines nombreuses sont entremêlées de filets stériles obtus.

Le pistil comprend cinq à six carpelles à style court. Il donne à maturité, pour fruit, un polyfollicule. Chaque follicule renferme de nombreuses graines munies d'une carène.

3. ANATOMIE

L'étude de la structure de l'appareil souterrain, utilisé pour nos recherches, nous a paru particulièrement intéressante.

PLANCHE I

AQUILEGIA NEMORALIS (J.)

Le rhizome cylindrique présente un suber et un phelloderme réduit à quelques assises (3 à 4). Des formations libéroligneuses constituées par 28 à 30 faisceaux entourent un parenchyme médullaire cellulosique.

Le nombre de ces massifs cribrovasculaires est d'ailleurs fonction directe de la tubérisation du rhizome.

Des coupes, faites en série, montrent une évolution très rapide de cette disposition en pachyte discontinue, vers la pachyte continue, au fur et à mesure que l'on se rapproche de la racine.

Les formations secondaires s'organisent en un anneau continu. Le liber secondaire, constitué de parenchyme libérien parsemé d'îlots de tubes criblés, est divisé en prismes libériens par des rayons médullaires allant en s'évasant vers l'extérieur.

Le bois secondaire comprend du parenchyme ligneux cellulosique et des lames ligneuses qui se différencient principalement en face des pointements de bois primaire. L'importance des formations secondaires augmente, tandis que se réduit la moelle.

Le rhizome présente donc une structure de transition entre celle de la tige aérienne et celle de la racine.

La racine (pl. II - fig. I) a une structure secondaire tout à fait classique. Aux formations subéro-phellodermiques fait suite un liber secondaire très développé,

constitué de parenchyme libérien avec des amas de tubes criblés. Le cambium circulaire donne vers l'intérieur un massif ligneux où les travées de vaisseaux (4 à 7) alternent avec un parenchyme ligneux cellulosique. Au centre du cylindre central, 2 faisceaux de bois primaire sont accolés par leur base.

La tige (pl. II - fig. 2), de section circulaire possède un épiderme glabre légèrement cuticularisé et épaissi sur les faces tangentielles.

L'écorce est constituée par quatre à cinq rangs de cellules parenchymateuses laissant entre elles des méats.

Un péricycle scléreux limite un cylindre central comprenant 25 à 30 faisceaux liberoligneux coiffés de calottes scléreuses. Cette structure, en pachyte discontinue, est caractérisée par une alternance régulière entre grands et petits faisceaux. Les arcs cambiaux intrafasciculaires ne donnent que quelques assises de tissus secondaires. Une vaste moelle occupe le reste du plerome.

Feuille : Le pétiole présente les mêmes caractères anatomiques que la tige. Toutefois les faisceaux cribro-vasculaires sont moins nombreux et de taille encore plus inégale.

On note la présence de quelques poils tecteurs unicellulaires.

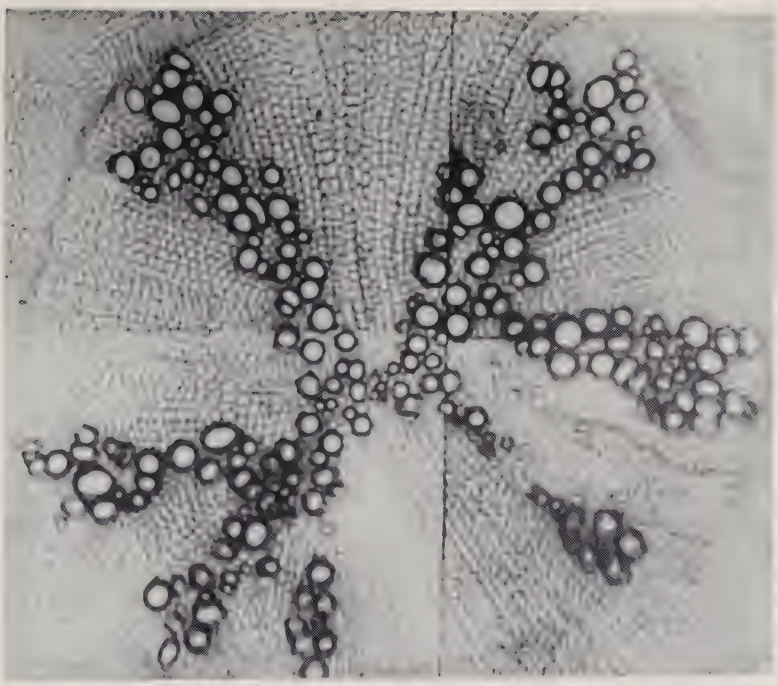


Fig. 1 - Racine

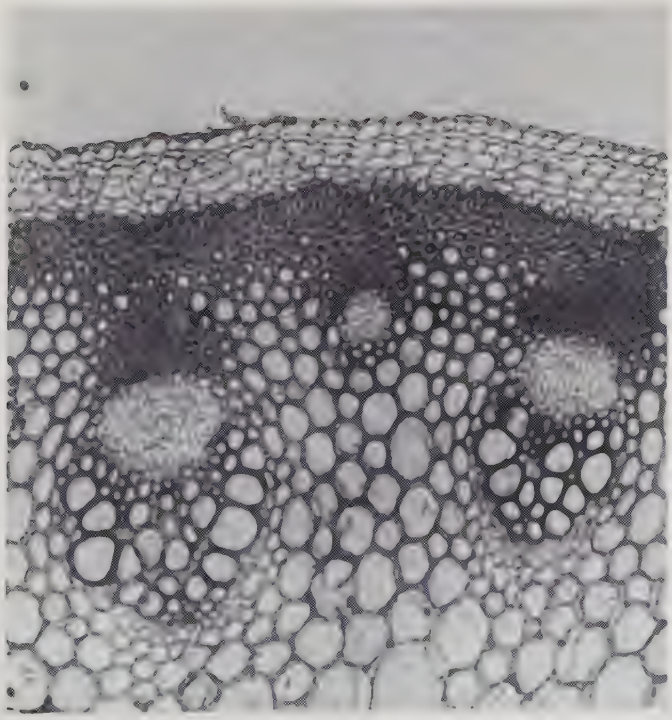


Fig. 2 - Tige aérienne

Le limbe a une structure normale ; cependant, dans le mésophylle, le tissu palissadique est peu différencié. L'épiderme inférieur possède de nombreux stomates et de longs poils tecteurs unicellulaires. Il n'y a, au niveau des nervures, ni collenchyme, ni fibres péricycliques, sauf chez les feuilles âgées.

CHAPITRE DEUX

ETUDE DE
AQUILEGIA PYRENAICA (DC)

1. REPARTITION ET HABITAT

Aquilegia pyrenaïca est bien défini par sa morphologie et son habitat. Cette espèce endémique affectionne les roches et éboulis calcaires de la région alpine des Pyrénées où elle se cantonne au dessus de 1200 mètres. C'est donc une plante de haute montagne.

2. MORPHOLOGIE EXTERNE

La plante est vivace par un rhizome court et gros qui se prolonge par une racine principale tubérisée.

La tige aérienne (15 à 20 centimètres), très grêle, presque nue, présente, à sa base, des feuilles petites, à contours arrondis, à pétioles longs et engainants. Les feuilles sont biternées, à folioles crènelées ou entières, glabres à la face supérieure, presque glabres à la face inférieure.

La tige se termine par une grande fleur (pl.III) d'un bleu intense, dont les 5 pétales ont un éperon droit et grêle, égalant ou dépassant à peine le limbe arrondi du pétale. Les étamines sont plus courtes que les pétales, les filets stériles sont aigus.

Le fruit comprend 5 à 6 follicules petits, longs

tout au plus de 10 à 15 millimètres, et renfermant des graines nombreuses et très petites.

3. ANATOMIE

Le rhizome montre un suber épais et très peu de phelloderme. Sa structure témoigne de l'évolution de la pachyte discontinue vers la pachyte continue par l'apparition d'arcs générateurs interfasciculaires.

Le liber et le bois secondaire sont toujours hétérogènes.

La moelle est plus ou moins réduite.

La racine (pl. IV - fig. 1) possède la structure secondaire : sous un liège superficiel assez épais, le phelloderme est réduit à 1 ou 2 rangs de cellules épaissies. Le liber secondaire très développé (1/3 du rayon) ne présente que peu de plages criblées.

La cambium circulaire forme à la pointe de 2 faisceaux de bois primaire centraux, deux lames de vaisseaux séparés par du parenchyme ligneux cellulosique.

La tige aérienne (pl. IV - fig. 2), de section arrondie, est d'un diamètre très réduit.

L'épiderme est constitué d'une couche de cellules cylindriques, fortement épaissies sur les faces tangentielles. Suivant les niveaux, il est glabre ou porte des poils tecteurs longs ou courts, parfois renflés à la base. Le parenchyme cortical n'est représenté

PLANCHE III

AQUILEGIA PYRENAICA (D.C.)

Fig. 1 - Racine

Fig. 2 - Tige aérienne

que par deux ou trois rangs de cellules aplaties séparées par des méats. Un anneau péricyclique, d'éléments très épaissis, limite le cylindre central. 10 à 15 faisceaux libéroligneux réguliers, coiffés de fibres, s'encastrent dans ce sclérenchyme péricyclique. Ils sont essentiellement constitués de tissu primaire, les formations secondaires étant réduites à quelques assises. La moelle, souvent sclérifiée à la périphérie des faisceaux, est parfois plus ou moins résorbée au centre.

Feuille : Le pétiole a la même structure que la tige avec, cependant, une réduction du nombre des faisceaux (10 à 12).

Quant au limbe, son mésophyle est limité par deux épidermes identiques formés de cellules à mince cuticule. Le tissu palissadique est constitué par deux ou trois rangs de cellules chlorophylliennes allongées.

Le tissu lacuneux occupe la moitié de l'épaisseur du limbe.

Les faisceaux libéroligneux des nervures sont ici accompagnés de collenchyme.

CONCLUSION

Les deux Ancolies étudiées se différencient très nettement par :

- leur habitat,
- leur morphologie externe,
- leur anatomie.

Nous rejoignons ainsi les conclusions de Mademoiselle BORDERES qui classe *A. pyrenaïca* dans la section Subscaposae ; *A. nemoralis* à côté de *A. vulgaris* dans la section Elatiores.

En outre, il est nettement établi que *A. nemoralis* constitue une espèce linnéenne et ne peut être considéré comme une variété de *A. vulgaris* dont il se distingue non seulement par sa morphologie externe mais par des caractères anatomiques qui lui sont propres. (voir tableau).

CARACTERES MORPHOLOGIQUES	CARACTERES ANATOMIQUES
A) Grande espèce à feuilles caulinaires (ELATORIES), à plusieurs fleurs : + tige pubescente - éperon des pétales très recourbé *A. VULGARIS* + tibe glabre - éperon légèrement recourbé *A. NEMORALIS*	A) Cellules de l'épiderme des tiges peu épaissies sur les faces tangentielles: + poils longs - 20 à 25 faisceaux libéroligneux *A. VULGARIS* + pas de poils - 25 à 30 faisceaux *A. NEMORALIS*
B) Petite espèce sans feuille caulinaire (SUBSCAPOSAE), une seule fleur : + tige légèrement pubescente - éperon droit *A. PYRENAICA*	B) Cellules de l'épiderme des tiges très épaissies sur les faces tangentielles: + poils longs ou courts - 15 faisceaux *A. PYRENAICA*

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHE DES ALCALOIDES

TRAVAUX ANTERIEURS

Les différents travaux entrepris sur les Ancolies ont abouti à des contradictions en ce qui concerne la nature de leurs principes actifs JORISSEN et HAIRS (10) (11), les premiers, en 1885 et 1891, découvrent que les organes verts de la plante contiennent un glucoside cyanogénétique. VANDERLINDEN et VAN de VEN (27),après avoir repris l'étude faite par les précédents auteurs, nient la présence d'acide cyanhydrique.

En 1897, DE KOCHEBRUNE (21) isole, des graines *d'Aquilegia vulgaris*, un alcaloïde qu'il nomme aquilégine.

En 1903, FOKIN (6) signale la présence, toujours dans les graines, d'un glucoside. Les avis sont donc très partagés et successivement VANDERLINDEN (26), puis KELLER (12), infirment ces différentes hypothèses.

En 1939, KUHN et SCHAFER (13) mettent en évidence la présence d'acide ascorbique. Tous les travaux effectués jusqu'alors portaient sur les graines (4) et les organes aériens.

En 1963 WINEK, BEAL et CAVA (29) s'attachent à l'étude des racines *d'Aquilegia hybrida, variété "SCOTT ELLIOTT"* (plante cultivée). En utilisant la chromatographie sur papier, ces chercheurs mettent en évidence plusieurs alcaloïdes ; parmi ceux-ci, plusieurs furent

identifiés : la magnoflorine, principal alcaloïde *d'Aquilegia hybrida* ; vient ensuite la berberine ; le troisième, appartenant sans doute à la série des bis-benzyl quinoleïne, fut appelé aquiléginine. Les mêmes auteurs étendent ensuite leur recherche à dix espèces différentes d'Ancolies (30), toujours par chromatographie sur papier, et en utilisant trois solvants différents :

Butanol 35 - Acide Acétique 5 - Eau 1 (BAE)
Propanol 2 - Ammoniaque 1 - Eau 1 (PAE)
Pyridine 310 - Acétate d'éthyle 750 - Eau 165 (PEE)

Au terme de leur étude comparative, ils arrivent à la conclusion que les racines des 10 espèces d'Aquilegia examinées contiennent toujours de la magnoflorine et très souvent de la berbérine accompagnée d'aquiléginine (8 espèces sur 10).

En outre, un 4ème alcaloïde, non identifié, existe dans *A. canadensis*.

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DES ALCALOIDES DE AQUILEGIA NEMORALIS (J)

1) CHOIX ET PREPARATION DU MATERIEL

Aquilegia nemoralis a été récolté dans la région sous pyrénéenne de CIERP, où il croit sur sol schisteux, riche en humus.

La cueillette s'effectue au moment de la floraison (fin mai).

Les plantes entières récoltées sont transportées immédiatement sur le lieu de travail, à l'aide d'enceintes réfrigérées (vase de DEWAR).

Là, les rhizomes et leurs racines sont prélevés, lavés rapidement, puis essuyés à l'aide de papier filtre.

Les parties souterraines, ainsi obtenues, sont divisées finement avant d'être séchées sous vide, à froid, en présence de chlorure de calcium.

Au bout de 48 heures, le matériel est sec et peut être conservé sous vide, sans risque d'altération.

Il est réduit par broyage à l'état de poudre demi-fine et passé au tamis (module 28).

2) OBTENTION DE L'EXTRAIT ALCALOIDIQUE

Notre premier souci a été de trouver une méthode d'extraction des alcaloïdes appropriée à notre matériel. Nous avons essayé deux méthodes différentes.

a - Méthode de la Pharmacopée de Genève : Nous

avons appliqué, en 1er lieu la technique décrite par la Pharmacopée internationale de Genève en 1951, dont le principe est le suivant :

La poudre, mise en présence d'une solution alcaline, cède, à l'état de base, à un solvant organique (chloroforme), les alcaloïdes qu'elle contient. Les alcaloïdes libérés sont transformés en chlorhydrates par addition de HCl.

Après une nouvelle alcalinisation, ils sont précipités à l'état de base en milieu aqueux, et peuvent ainsi être recueillis.

Mode opératoire : 50 grammes de poudre sont placés dans une fiole conique avec 200 ml de chloroforme ; le mélange est agité mécaniquement pendant 30 minutes. Après avoir ajouté 20 ml d'eau, on procède à une nouvelle agitation. On décante sur un entonnoir en verre fritté, à l'aide de la trompe à vide. Le résidu est repris par une nouvelle quantité de solvant et soumis au même traitement que précedemment. Après décantation, on réunit les 2 filtrats et on les évapore à sec. Le résidu d'évaporation est repris par une quantité suffisante d'acide chlorhydrique $\frac{N}{10}$, puis agité pendant 30 minutes. On centrifuge pour séparer les substances résineuses et les matières grasses. Le surnageant limpide est alcalinisé jusqu'à pH = 9 afin de libérer les alcaloïdes à l'état de base.

Une étude quantitative nous a malheureusement

permis de constater que cette méthode, si elle permet d'éliminer les substances non alcaloïdiques entraîne de grosses pertes.

Il nous est apparu nécessaire de faire appel à une deuxième méthode qui est en fait une lixiviation.

b - Lixiviation : Nous avons voulu extraire de la poudre les principes solubles par un épuisement progressif, au moyen d'un solvant approprié. L'appareil utilisé est un percolateur, et le solvant employé l'éthanol à 70. Ce dernier a été choisi pour sa grande polarité, ce qui permet, dans notre cas, d'extraire aussi bien les alcaloïdes primaires et secondaires, que tertiaires et quaternaires.

Mode opératoire : La poudre est humectée avec l'éthanol à 70 puis passée au tamis module 32. Elle est abandonnée 4 heures en vase clos, et est ensuite repassée au tamis, pour éviter les agrégats. On la dispose en couches minces, peu tassées, dans le percolateur, et l'on ajoute juste assez de liquide pour la recouvrir.

Après une macération de 48 heures, on laisse le liquide s'écouler, en rétablissant constamment le niveau de l'éthanol, jusqu'à ce que le volume recueilli corresponde à 10 fois le poids de la poudre. L'absence d'alcaloïdes dans les derniers millilitres recueillis est verifiée au moyen du réactif de DRAGENDORFF.

C'est sur la colature ainsi obtenue que nous avons effectué l'étude des alcaloïdes de la plante.

3) SEPARATION DES ALCALOIDES

Plusieurs techniques ont été essayées.

Nous avons d'abord mis en oeuvre un procédé très utilisé en toxicologie et mis au point par OTTO et OGIER : le procédé de STASS. (22)

a - Procédé de STASS : Les alcaloïdes, en présence d'acide organique, donnent des sels solubles en milieu hydro-alcoolique. Ces sels sont décomposés par action d'un alcali faible (bicarbonate). Les alcaloïdes libérés sous forme de base, sont extraits par un solvant organique (éther éthylique).

Mode opératoire : 100 ml de solution alcoolique sont acidifiés par de l'acide tartrique, puis placés à l'étuve à 30° pendant 12 heures. La solution tartrique est alors évaporée sous vide à une température inférieure à 30°. On recueille ainsi des tartrates d'alcaloïdes.

Le résidu est repris par 100 ml d'eau.

La solution aqueuse ainsi obtenue est épuisée par l'éther, dans une ampoule à décanter (4 fois 100 ml d'éther). Ce traitement a pour but de vérifier qu'il n'y a pas d'alcaloïdes solubles dans l'éther en milieu acide.

Les liqueurs éthérées sont réunies et évaporées à sec, le résidu est repris par de l'alcool méthylique.

On contrôle à l'aide du réactif de Dragendorff l'absence de tout alcaloïde soluble en milieu acide.

100 ml d'éther sont ajoutés dans l'ampoule à décanter et le milieu est alcalinisé par du carbonate monopotassique (pH = 8,5).

Les alcaloïdes sont extraits par 400 ml d'éther, utilisés en quatre fractions de 100 ml, qui sont ensuite réunies et évaporées.

Une réaction au Dragendorff, faite sur le résidu d'évaporation repris par du méthanol est positive.

L'extraction par la méthode de STASS est complétée par une séparation par chromatographie sur couche mince de gel de silice. (23) (24).

- Chromatographie sur couche mince : Nous utilisons pour support le gel de silice G MERCK sous une épaisseur de 1/2 mm avec le solvant de Partridge (butanol 40 ; Acide Acétique 10 ; Eau 50) comme phase mobile. Les migrations sont faites à la température de 20° ± 2°.

La révélation par le réactif de Dragendorff ne fait apparaître qu'une seule bande de couleur orangé.

Conclusion : cette bande unique nous conduit à supposer que la méthode pourrait être insuffisante et nous avons tenté l'extraction par une méthode qui fait intervenir les reineckates.

b - Méthode des reineckates : Nous avons donc

essayé et adopté la méthode de séparation et de purification utilisée par WINEK et ses collaborateurs. Dans cette méthode l'extrait alcoolique obtenu, est évaporé à sec et dissous dans une solution alcaline.

Les alcaloïdes libérés sont entraînés par un solvant organique (chloroforme).

La fraction aqueuse résiduelle, contenant les alcaloïdes non solubles dans le chloroforme, est traitée par le sel de Reinecke.

Les alcaloïdes précipitent sous forme de reineckates et sont ensuite libérés sous forme de chlorhydrates.

Mode opératoire : La colature obtenue est concentrée sous pression réduite, dans une évaporateur rotatif, à la température de 30°, pour éliminer la plus grande partie du solvant. On obtient un résidu pâteux que l'on reprend avec NH_4OH N. On réalise ensuite une extraction liquide-liquide, à l'aide de chloroforme, jusqu'à réaction négative au réactif de Dragendorff.

Cette solution chloroformique est acidifiée par HCl N.

Les alcaloïdes passent à l'état de chlorhydrates.

Après une nouvelle alcalinisation, ils sont extraits par du chloroforme. Cette nouvelle extraction permet l'abandon d'impuretés non alcaloïdiques.

Nous obtenons ainsi un *bloc alcaloïdique A*, relativement pur, contenant, à l'état de base, les composés solubles dans le chloroforme.

Les fractions aqueuses résiduelles sont réunies et soumises au test du réactif de VALSER (25) qui indique la présence d'alcaloïdes.

Nous nous sommes ensuite attachés à précipiter ces alcaloïdes sous forme de reineckates.

La solution amenée à pH = 2 par addition d'HCl N, est traitée avec une solution de sel de Reinecke à 5% dans un mélange comportant une partie d'acide acétique pour deux parties d'eau.

On ajoute d'un seul coup le réactif précipitant à la solution aqueuse chlorhydrique. On agite fortement, on laisse quelques heures le mélange au réfrigérateur. On filtre sur un entonnoir de Büchner. Le précipité est lavé à l'éther éthylique, puis placé 12 heures à l'étuve à 37°, en présence de Cl_2 Ca. On le dissout ensuite dans 10 parties d'acétone anhydre et on ajoute 1 partie d'eau, puis une partie d'HCl N, dans l'ordre cité, ceci afin d'éviter une précipitation éventuelle des reineckates d'alcaloïdes, en milieu acide trop fort.

On obtient alors une liqueur colorée en rouge que l'on traite par une quantité suffisante d'une solution à 10% Hg Cl_2 dans un mélange à parties égales d'acétone et d'HCl N (méthode de Panouse). (18)

L'acétone est chassée sous pression réduite.

On obtient un précipité pâteux de reineckates de

mercure, tandis que le liquide surnageant limpide contient les chlorhydrates d'alcaloïdes.

Après avoir lavé le précipité et joint les eaux de lavage à la solution initiale, on évapore à sec, à basse température, sous pression réduite. Le résidu, repris par du méthanol, constitue le *bloc alcaloïdique B*, renfermant les alcaloïdes sous forme de chlorhydrates.

Les fragmentations ont été effectuées par trois procédés chromatographiques :

- sur papier,
- sur colonne d'alumine,
- sur couche mince de gel de Silice. (19)

4) FRAGMENTATION DES BLOCS ALCALOIDIQUES A ET B

a - Par chromatographie sur papier : Nous avons utilisé le papier WHATMAN n° 1 découpé aux dimensions 24/32.

Après avoir essayé plusieurs éluants, notre choix s'est porté sur le B - A - E (35. 5. 1) et nous avons opté pour la méthode descendante.

Nous déposons, sur la ligne de départ, des solutions des blocs alcaloïdiques A et B.

Le chromatogramme est mis à saturer durant 12 heures. L'équilibre s'étant établi entre les différentes phases, nous laissons la migration s'effectuer pendant

8 heures.

Après passage à l'étuve ventilée, de façon à chasser toute trace de solvant, nous révélons au réactif de Dragendorff modifié par Munier. (16)

Nous avons ainsi obtenu :

3 taches dans la *fraction A* :

- 1 très légère de Rf = 0.60
- 1 autre importante de Rf = 0.70
- une troisième également importante de Rf = 0.93

5 taches dans la *fraction B* :

- une de Rf = 0.60 très forte
- une de Rf = 0.24
- une de Rf = 0.65
- deux taches de Rf respectifs = 0.93 et 0.70 mais très faibles.

Conclusion : La séparation en fraction A et B n'est donc pas rigoureuse. Le bloc A contient en faible quantité l'alcaloïde de Rf = 0.60, et le bloc B renferme des traces des deux alcaloïdes de Rf 0.93 et 0.70. Cependant, compte-tenu des concentrations, cette séparation peut être considérée comme suffisante pour permettre l'étude des alcaloïdes contenus dans les différents blocs. La fraction chloroformique entraîne essentiellement 2 alcaloïdes de Rf = 0.70 et 0.93 ; la solution aqueuse contient l'alcaloïde de Rf = 0.60 en quantité importante.

Cette chromatographie nous a été utile en nous montrant l'existence de plusieurs alcaloïdes dans chacun des blocs.

b - Chromatographie sur colonne : Avant d'aborder la séparation quantitative des alcaloïdes, nous avons dû comme l'indiquent WINEK et Coll. purifier chaque bloc alcaloïdique par un passage préliminaire sur colonne.

Nous préparons une colonne d'Alumine de 20 cm de hauteur et de 2 cm de diamètre (gel d'alumine neutre : activité I.)

Les deux blocs A et B sont successivement soumis au même traitement :

- On dépose la fraction alcaloïdique en haut de la colonne,
- On épuise au méthanol jusqu'à réaction négative au réactif de Dragendorff.
- On concentre à faible volume les liqueurs méthanoliques recueillies.

Les fractions A et B initiales sont ainsi débarrassées de la plus grande partie des impuretés résiduelles.

Après cette purification les alcaloïdes sont séparés par chromatographie sur colonne.

La fragmentation des blocs alcaloïdiques a été obtenue par chromatographie sur une colonne d'alumine neutre WOELM grade I, de 1 mètre de hauteur et de treize

mm de diamètre.

Le principe de l'expérience est de soumettre le mélange, versé en haut de la colonne, à l'action d'une série de solvants de polarité croissante, qui déplacent les substances en commençant par celles qui sont le moins fortement adsorbées sur le support. Les fractions de l'éluat sont recueillies séparément. Les solvants, ou mélange de solvants, utilisés ont été les suivants :

FRACTION : A	FRACTION : B
Chloroforme + 1% Ethanol	
Chloroforme + 30% Ethanol	Chloroforme + 0,5% Ethanol
	Chloroforme + 2% Ethanol
	Chloroforme + 5% Ethanol
	Chloroforme + 10% Ethanol
	Chloroforme + 25% Ethanol
	Chloroforme + 50% Ethanol
Ethanol absolu	Ethanol absolu
Ethanol + 50% d'Acétate d'éthyle	Ethanol + 50% Acétate d'éthyle
Acétate d'éthyle	Acétate d'éthyle
Méthanol acidifié	Méthanol acidifié

Chaque fraction s'écoule dans un temps moyen de deux heures.

Après avoir réduit le volume de chaque éluat, nous avons réalisé pour chacun d'eux une chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1, avec pour solvant le B.A.E. (35 - 5 - 1).

Nous avons obtenu les résultats suivants :

FRACTION A (alcaloïdes solubles dans le chloroforme)			
ELUANTS	Nbre de Spots	FLUORESCENCE	Rf au Dragendorff
Chloroforme + 1% d'Ethanol	0		
Chloroforme + 30% d'Ethanol	3	Bleue très lumineuse	0.60
		Jaune intense	0.70
		Violet foncé	0.93
Ethanol absolu	3	Bleue très lumineuse	0.60
		Jaune intense	0.70
		Violet foncé	0.93
Ethanol absolu +50% Acétate d'éthyle	0		
Acétate d'éthyle	0		
Méthanol acidifié	0		

FRACTION B (alcaloïdes solubles dans l'eau)			
ELUANTS	Nbre de Spots	FLUORESCENCE	Rf au Dragendorff
Chloroforme 0,5%			
Ethanol	2		
Chloroforme 2%			
d'Ethanol	2		
Chloroforme 5%			
d'Ethénol	2	Bleue	0.60
Chloroforme 10%			
d'Ethanol		Violet foncé	0.93
Chloroforme 25%			
d'Ethanol	2		
Chloroforme 50%			
d'Ethanol	2		
Ethanol absolu	1	pas de fluorescence	0.24
Ethanol + 50%			
'acétate d'éthyle	1	violet sombre à	0.65
Acétate d'éthyle	1	254 nμ	0.65
Méthanol acidifié	1	jaune intense	0.70

Conclusions : En ce qui concerne la fraction A, seules 2 solutions renferment des alcaloïdes ; l'une et l'autre en contiennent trois. Leur composition ne semble

pas présenter de différence, compte tenu des Rf.

Pour la fraction B : on retrouve, en plus des trois précédents, deux nouveaux alcaloïdes.

C'est au total 5 alcaloïdes qui sont ainsi mis en évidence.

Ces résultats confirment ceux obtenus par chromatographie sur papier.

Cette méthode est satisfaisante mais le temps d'élution est très long.

Nous avons donc cherché une méthode plus pratique, ne nous obligeant pas à attendre des heures le passage des solvants.

Nous nous sommes adressé à la chromatographie sur couche mince pour séparer les alcaloïdes ainsi mis en évidence.

c - Chromatographie sur couche mince : Nous utilisons des plaques de 20 cm sur 40 cm recouvertes d'une couche de 1 mm d'épaisseur de gel de Silice G. Le solvant est le B.A.E. (35-5-1).

Les plaques sont soumises à la température de 80°, pendant 2 heures, en étuve ventilée, et activées par passage au four à 110°, pendant 2 heures.

Après refroidissement, nous déposons au moyen d'un appareil pour dépôt en bandes "autoliner", des solutions peu concentrées, des blocs alcaloïdiques A et B.

• Les plaques sont ensuite placées dans les cuves, avec comme éluant le mélange B.A.E. (35-5-1). La migration dure 4 heures.

Après séchage à 30° pendant 2 heures, nous révélons, à l'aide du réactif de Dragendorff, une fine bande latérale de 1 cm de large, afin de localiser les alcaloïdes. Nous pouvons ainsi compléter notre étude par un examen en lumière ultra-violette.

Résultats :

BLOC A	
1° bande - Fluorescence bleue	- Réaction peu intense au Dragendorff
2° bande - Fluorescence jaune	- Réaction assez intense au Dragendorff
3° bande - Fluorescence bleutée	- Réaction peu intense au Dragendorff
4° bande - Non fluorescente	- Réaction intense au Dragendorff

BLOC B		
1° Bande proche du départ	- Fluorescence bleue	- Réaction intense au Dragendorff
2° bande sur le front	- Fluorescence bleue	- Réaction peu intense Dragendorff

Les différentes bandes d'alcaloïdes sont recueillies séparement par aspiration. Les alcaloïdes fixés sur le gel de silice en sont séparés, à l'aide de méthanol purifié, par plusieurs agitations et décantations successives. Avant chaque décantation, la silice est séparée du méthanol par centrifugation, (5000 tours/minute pendant 20 minutes) avant d'être épuisée à nouveau.

Les solutions méthanoliques sont concentrées sous vide.

Conclusion : Nous avons ainsi pu isoler, dans un état de pureté satisfaisante, les divers alcaloïdes de l'espèce *Aquilegia nemoralis*.

La difficulté de cette méthode réside dans le fait que les alcaloïdes se détachent mal du gel de si-

lice G, ce qui peut entraîner des pertes notables.

Pour caractériser ces alcaloïdes, nous avons essayé de les obtenir à l'état cristallisé.

d- Obtention des alcaloïdes à l'état cristallisé : Les solutions méthanoliques concentrées sont placées 24 heures au réfrigérateur. Un dépôt se forme, constitué par la silice G qui a été entraînée par le méthanol. Ce dépôt est éliminé par centrifugation. Les solutions sont alors additionnées de 10 gouttes d'une solution éthanolique d'iodure de Sodium à saturation.

On laisse 12 heures au réfrigérateur et l'on obtient une cristallisation des alcaloïdes sous forme de iodhydrates d'alcaloïdes. Les cristaux sont recueillis par filtration.

Nous avons ainsi, après élution et cristallisation, recueilli dans le :

- *bloc A* : 2 alcaloïdes : alc n°1 et alc n° 2 correspondant respectivement à la 2ème et 4ème bande alcaloïdique,
- *bloc B* : nous avons séparé et obtenu l'alcaloïde n° 3 (1° bande).

Conclusion : La chromatographie sur couche mince nous a permis d'obtenir à l'état cristallisé trois alcaloïdes :

- alcaloïde n° 1 dans le bloc A

- alcaloïde n° 2 dans le bloc A
- alcaloïde n° 3 dans le bloc B

5) *IDENTIFICATION DES ALCALOIDES CRISTALLISES*

Pour l'identification des alcaloïdes cristallisés nous avons utilisé :

- la chromatographie sur papier en présence d'alcaloïdes témoins,
- la spectrographie ultra-violette,
- la spectrographie infra-rouge.

a - Chromatographie sur papier : Nous employons le papier Watman n° 1. Nous opérons toujours à une même température, et veillons à ce que les temps de saturation soient respectés.

Si nous utilisons la chromatographie ascendante, notre solvant est le B.A.E. Pour la chromatographie descendante nos solvants sont le P.A.E. et le P.E.E.

Nous les avons choisis afin de pouvoir comparer nos résultats avec ceux de WINEK, BEAL et CAVA.

L'identification des alcaloïdes mis en solutions méthanoliques est faite par comparaison avec deux alcaloïdes témoins : la berbérine et la magnoflorine.*

---

* Nous remercions le Dr. C.L WINEK (Duquesne University) PITTSBURG U.S.A., de nous avoir envoyé les spectres infrarouges de la magnoflorine et de l'aquileginine, ainsi que de la magnoflorine cristallisée.

Nous déposons les taches de façon suivantes: (pl. V)

berbérine témoin :

alcaloïde n° 1

alcaloïde n° 2

alcaloïde n° 3

magnoflorine témoin :

Nous obtenons les résultats suivants :

Avec le B.A.E. :

Alcaloïde n° 1 .... Tache de Rf = 0.41, fluorescence jaune et de Rf égal à celui de la berbérine témoin,

Alcaloïde n° 2 .... Tache de Rf = 0.84 sans fluorescence,

Alcaloïde n° 3 .... Tache de Rf = 0.55 à fluorescence bleue de même Rf que la magnoflorine témoin.

Avec les deux autres solvants (P.A.E. et P.E.E) les Rf obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

	B.A.E.	P.E.E.	P.A.E.	Fluorescence en U V
Berbérine témoin	Rf = 0.41	0.35	0.58	Jaune
Alcaloïde n° 1	Rf = 0.41	0.35	0.58	Jaune
Alcaloïde n° 2	Rf = 0.84	0.54	0.85	Sans
Alcaloïde n° 3	Rf = 0.55	0.26	0.54	Bleue
Magnoflorine témoin	Rf = 0.55	0.26	0.54	Bleue

Conclusions : *Alcaloïde n° 1 = berbérine* (comparaison avec berbérine témoin),

Alcaloïde n° 2 = aquiléginine (comparaison avec les Rf obtenus par l'équipe des chercheurs américains),

Alcaloïde n° 3 = magnoflorine (comparaison avec la magnoflorine témoin).

L'étude spectrographique de ces corps va nous permettre de les identifier avec certitude.

En plus des alcaloïdes précédemment cités, nous avons mis en évidence 2 corps à réaction alcaloïdique de Rf = 0.24 et 0.65 dans le B.A.E., 0.30 et 0.84 dans le P.E.E., 0.60 et 0.85 dans le P.A.E.. Malheureusement la faible quantité de matière première ne nous a pas permis d'approfondir cette étude.

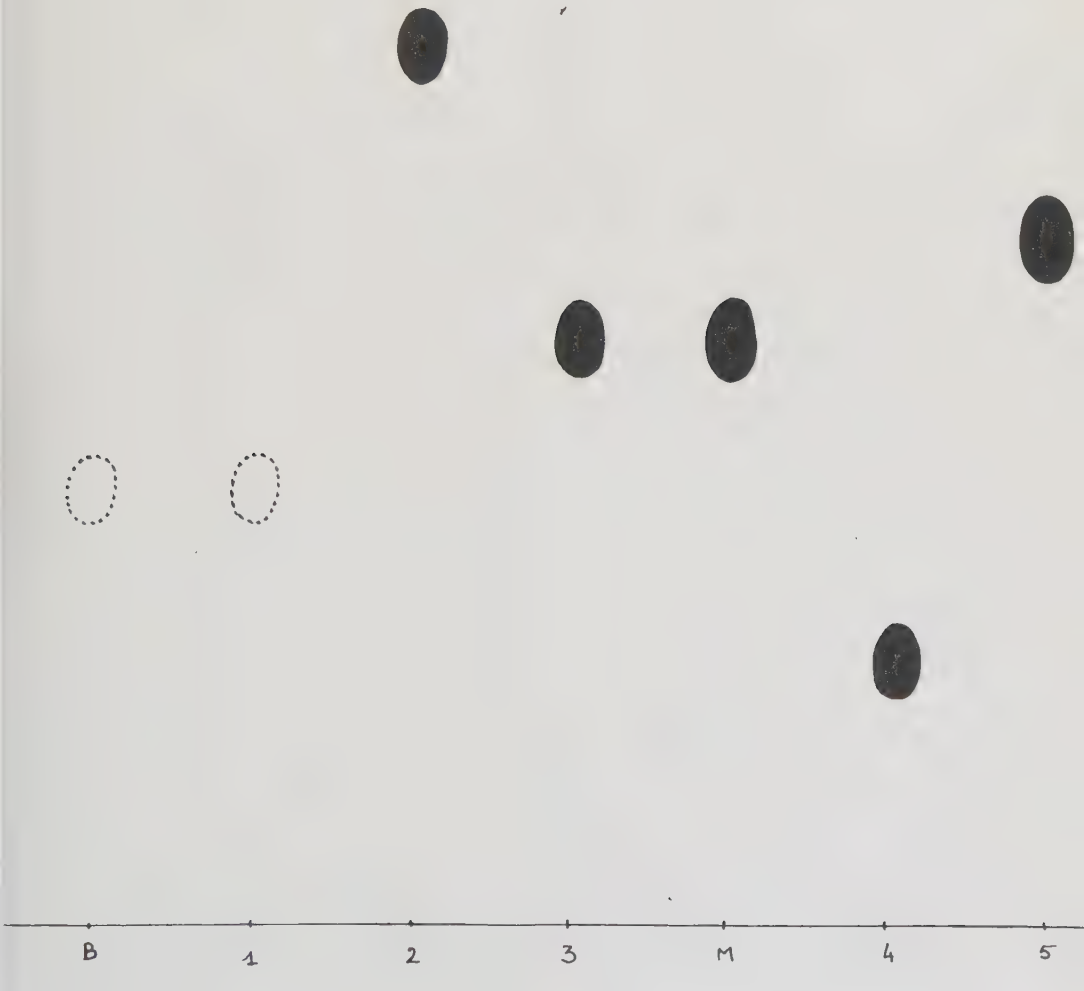
C'est donc, en définitive, 5 corps alcaloïdiques que nous avons mis en évidence dans *A. nemoralis*.

b -Spectrographie ultra-violette : Nous avons effectué nos déterminations sur un spectrophotomètre UNICAM SP 800. Les alcaloïdes sont mis en solution dans de l'eau bidistillée acidulée à 1%.

PLANCHE V

AQUILEGIA NEMORALIS :

Chromatographie sur papier dans le B.A.E.



Nos mesures sont effectuées entre 210 et 400 nanomètres.

Nous obtenons :

- Pour l'*alcaloïde n°* 1 : 3 maximums aux longueurs d'onde

(pl.VIfig.1) 231 nanomètres
267 "
349 "

Ce spectre est identique à celui de la berbérine, les maximums donnés par le témoin se situant aux mêmes longueurs d'onde.

- Pour l'*alcaloïde n°* 2 : 2 maximums de longueurs d'onde

(pl.VI fig.2) 233 nanomètres
285 "

Cela correspond aux maximums du spectre du produit de référence qui est l'aquiléginine.

- Pour l'*alcaloïde n°* 3 : 3 maximums bien déterminés aux longeurs d'onde

(pl.VI fig.3) 224 nanomètres
268 "
303 "

Ces maximums sont identiques à ceux obtenus avec la magnoflorine témoin.

c - Spectrographie infra-rouge : Nos échan-

tillons sont incorporés à une pastille de bromure de potassium. Nous utilisons un spectro-photomètre enregistreur UNICAM SP 200 G.

Les spectres des alcaloïdes 1, 2 et 3 sont respectivement identiques à ceux des témoins déjà utilisés : berbérine, aquiléginine, magnoflorine (Cf Spectrogrammes : planches VII, VIII et IX.)

Conclusions : Les études chromatographiques et spectrophotométriques, par leur concordance parfaite, nous permettent d'identifier d'une façon certaine, dans *Aquilegia nemoralis*, trois alcaloïdes : la *berbérine*, *l'aquiléginine* et la *magnoflorine*.

Nous connaissons la formule de la Berbérine (14) et de la Magnoflorine (8).

Celle de l'aquiléginine est encore incomplètement connue.

Nous espérons qu'une étude ultérieure permettra l'identification des deux autres alcaloïdes, ainsi que la détermination de leur structure.

PLANCHE VI

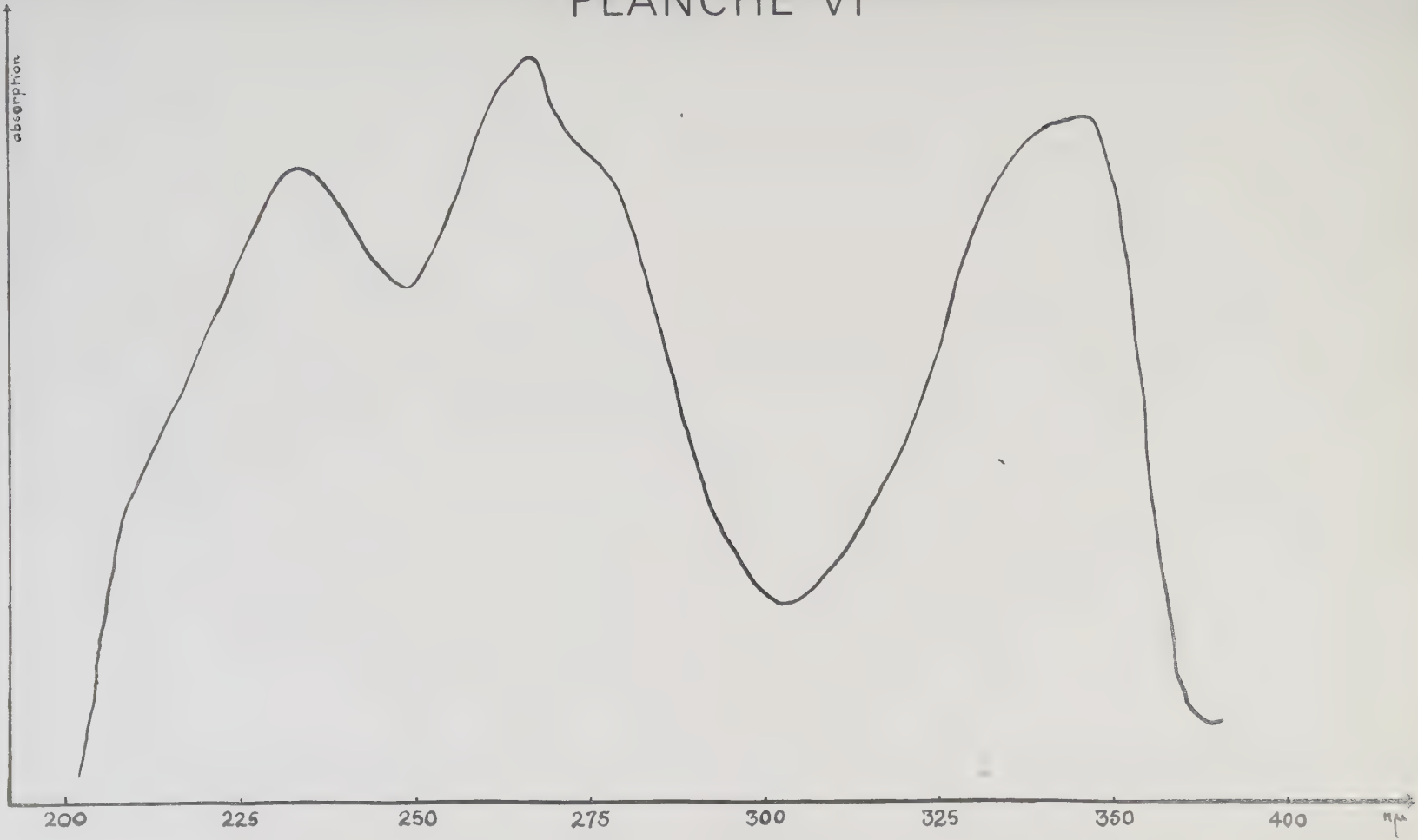


Figure 1 : Alcaloïde N° 1

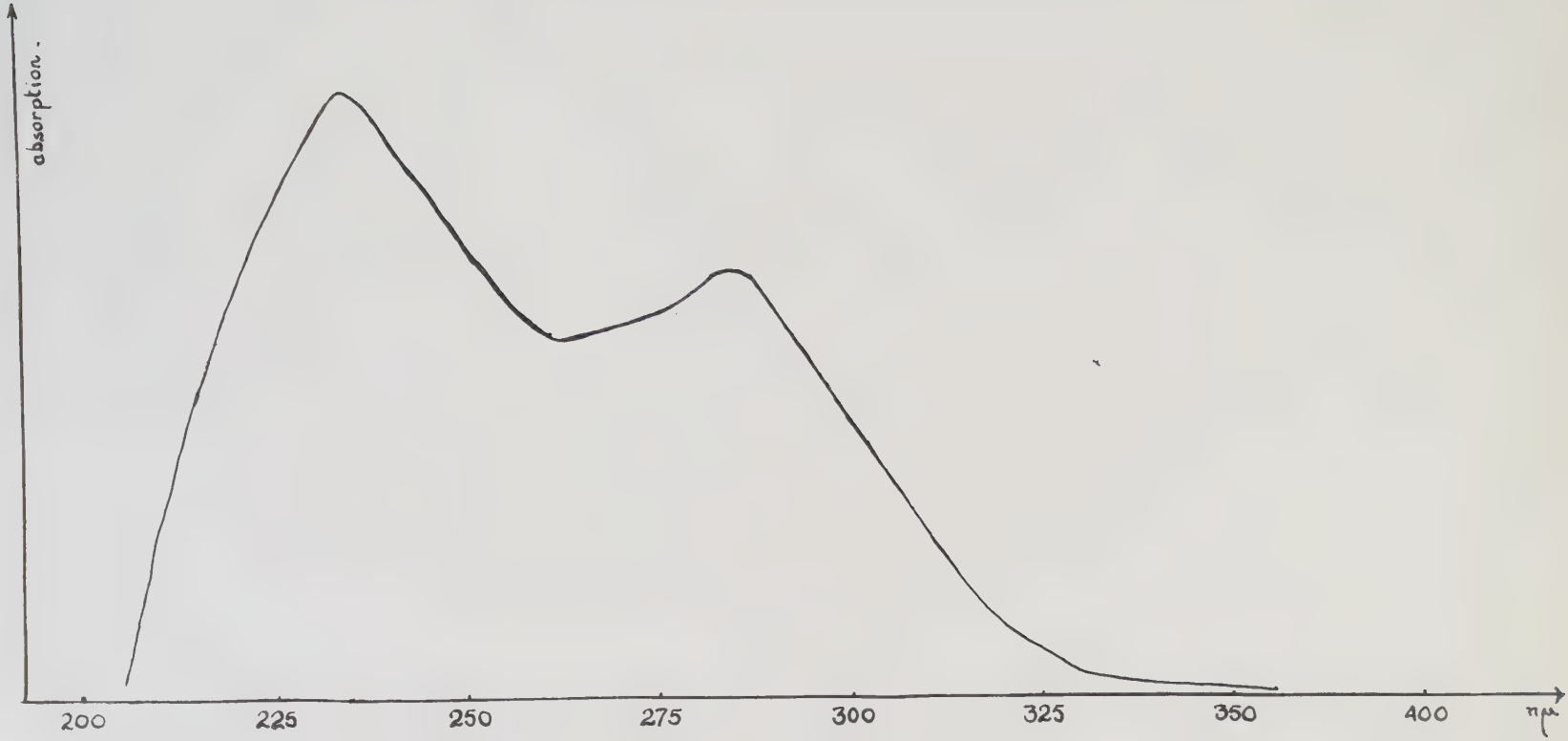


Figure 2 : Alcaloïde N° 2

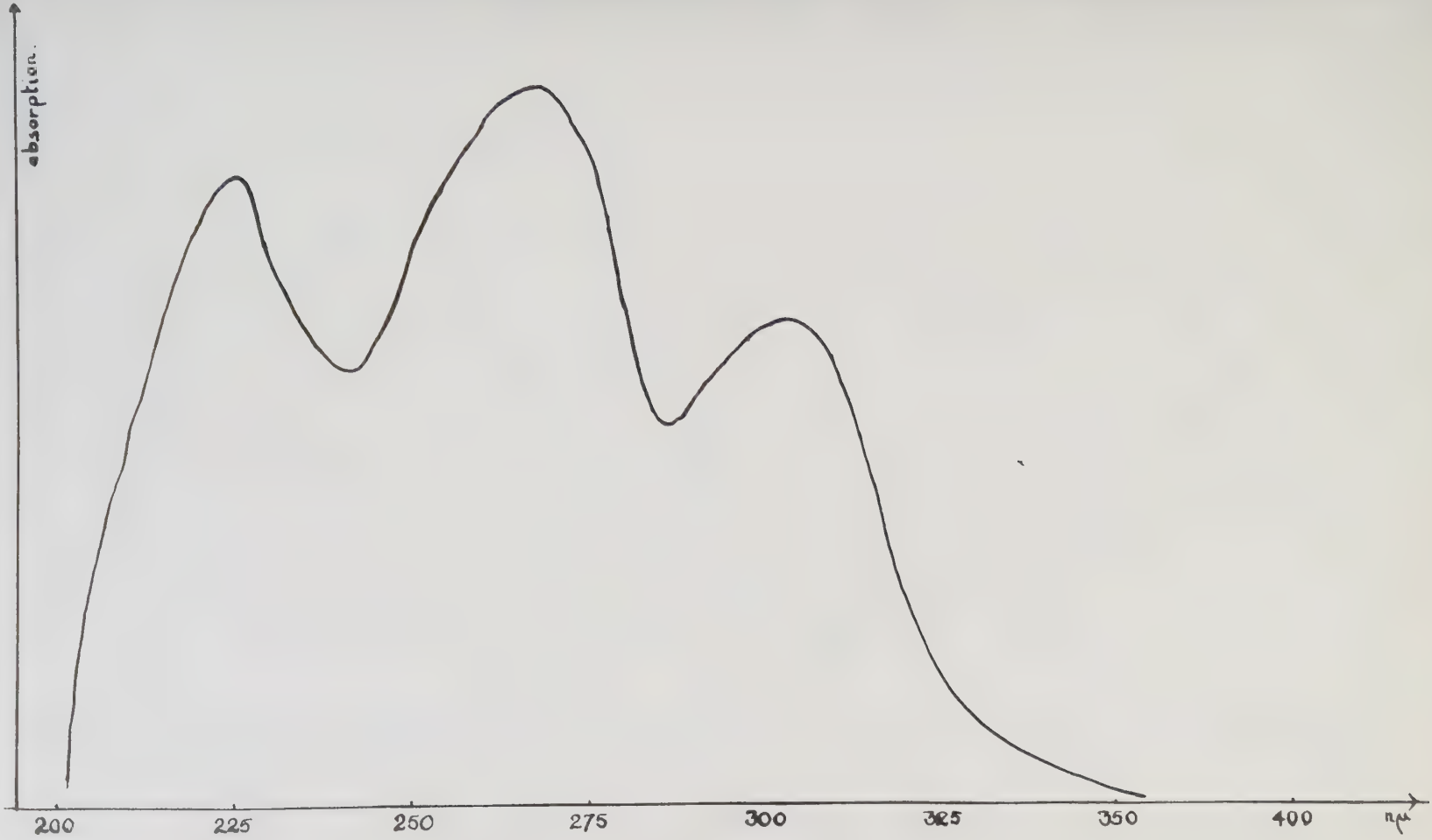
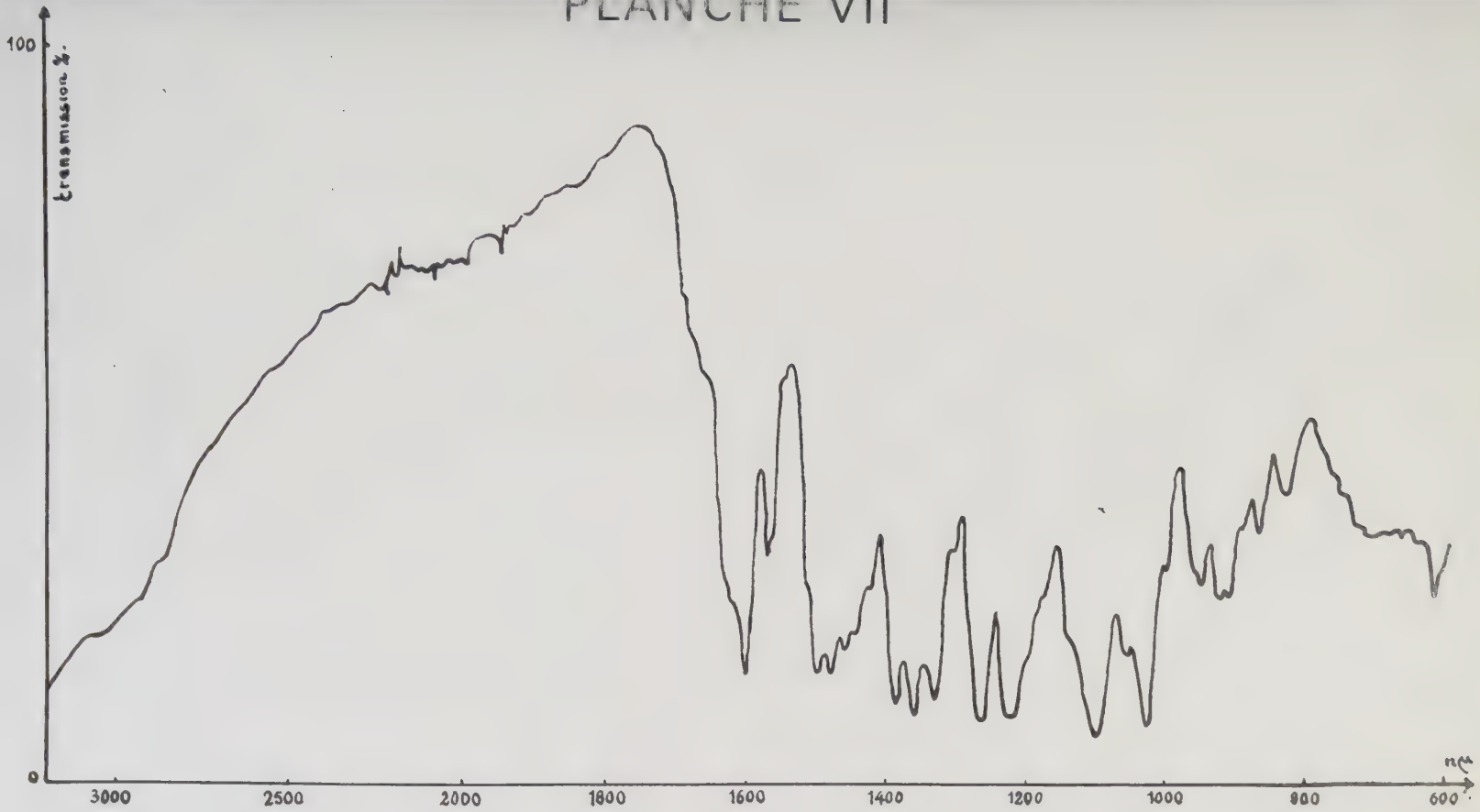


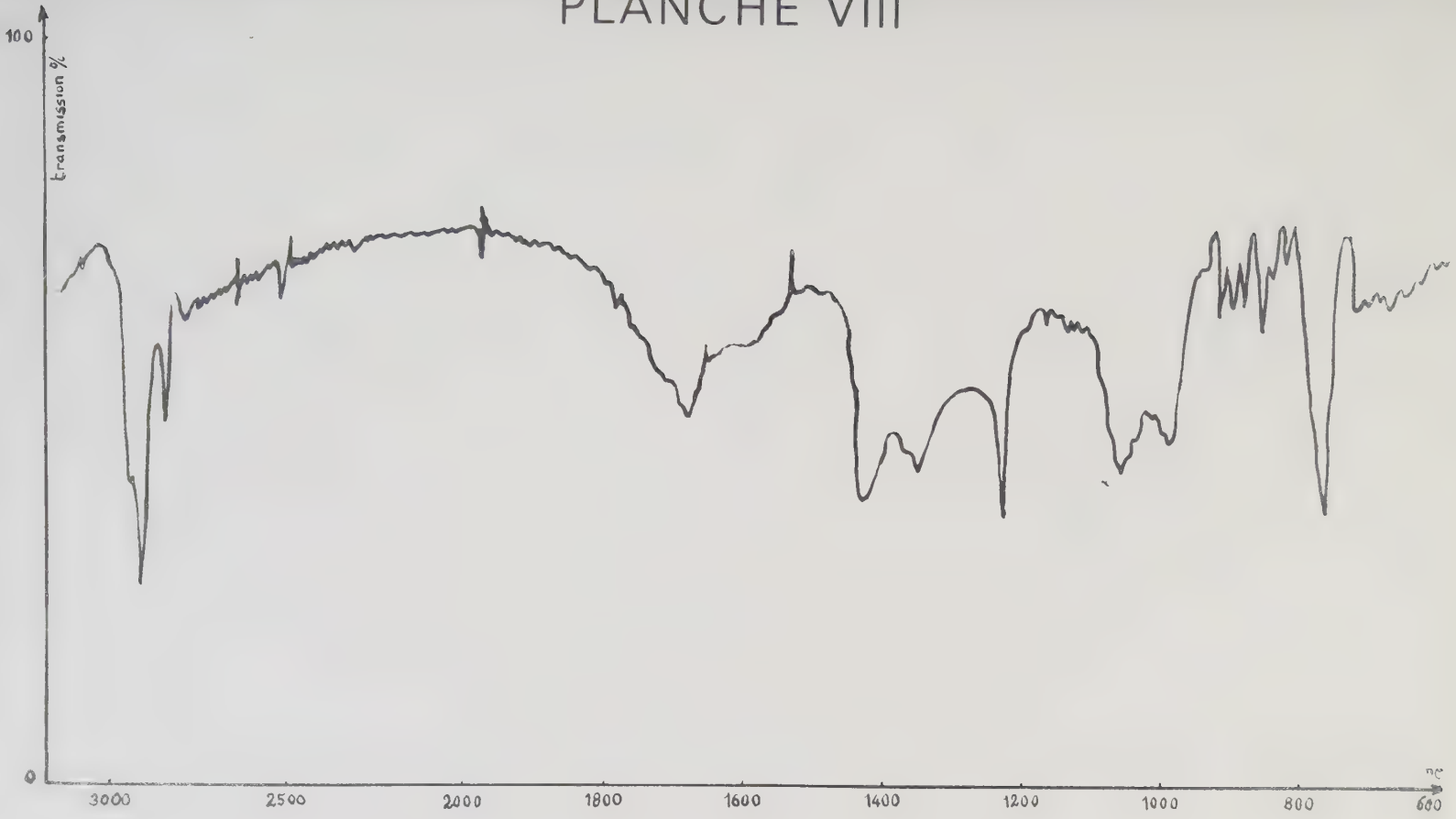
Figure 3 : Alcaloïde N° 3

PLANCHE VII



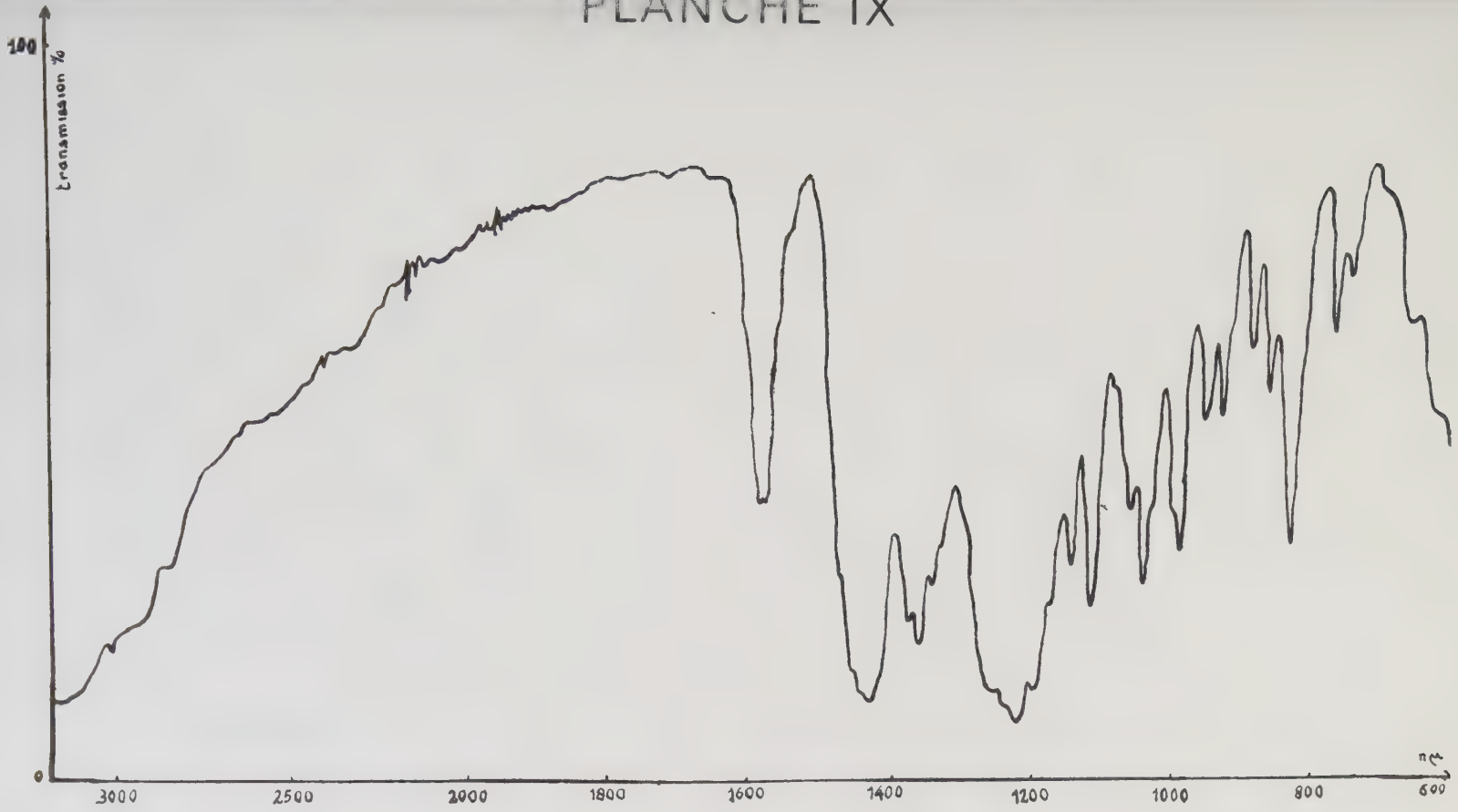
SPECTRE I.R. : Alcaloïde N° 1.

PLANCHE VIII

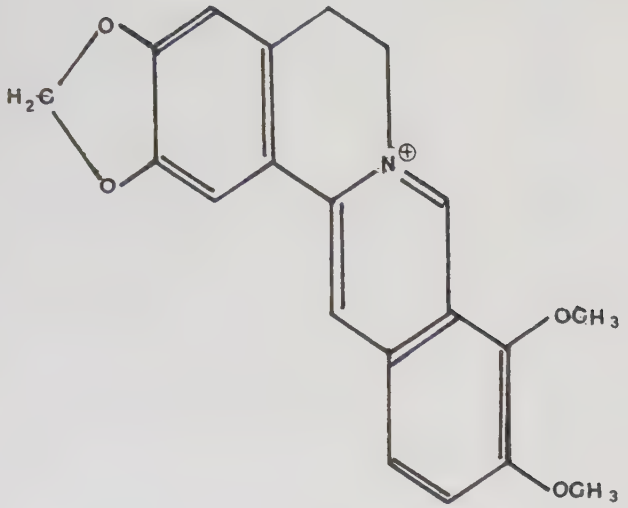


SPECTRE I.R. : Alcaloïde N° 2

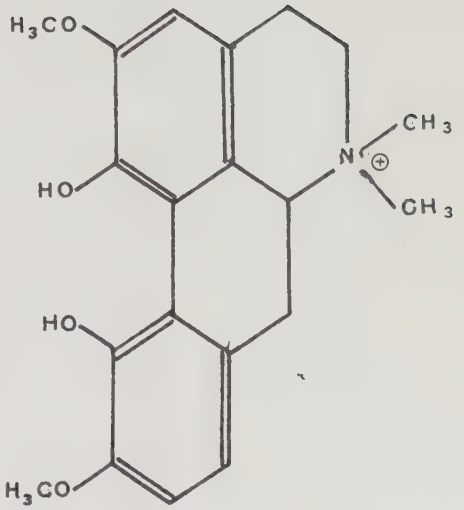
PLANCHE IX



SPECTRE I.R. : Alcaloïde N° 3



BERBERINE



MAGNOFLORINE

CHAPITRE DEUX

ETUDE CHIMIQUE
DE AQUILEGIA PYRENAICA (DC)

Après l'étude chimique de *Aquilegia nemoralis*, nous avons abordé celle *d'Aquilegia pyrenaïca*.

Nous avons trouvé *Aquilegia pyrenaïca* au col du Soulor à 1700 mètres d'altitude, sur sol rocailleux. Sa floraison, plus tardive, à lieu fin août, début septembre.

Les travaux effectués pour l'étude des alcaloïdes portent sur la tige rhizomateuse et la racine.

1) OBTENTION DE L'EXTRAIT ALCALOIDIQUE

Le matériel utilisé est séché sous vide, à froid, en présence de chlorure de Calcium.

Après pulvérisation et tamisage, la poudre est épuisée par lixiviation avec l'éthanol à 70.

Le résidu sec est repris par une solution d'HCl N jusqu'à pH=3. Les résines et matières grasses sont éliminées par centrifugation. La liqueur limpide est alcalinisée par NH_4 OH N jusqu'à pH = 10, et épuisée par le chloroforme.

Les différentes liqueurs chloroformiques sont réunies, puis traitées par de l'eau acidulée à 10%.

Les alcaloïdes passent dans la phase aqueuse sous forme de chlorhydrates.

La phase aqueuse est de nouveau alcalinisée, et les alcaloïdes enlevés par le chloroforme, jusqu'à

réaction négative de la phase aqueuse en présence du réactif de Dragendorff.

Les liqueurs chloroformiques réunies et concentrées sous vide constituent *la fraction A*.

Les solutions basiques résiduelles, contenant les alcaloïdes solubles dans l'eau, sont acidifiées jusqu'à pH = 2, puis traitées par une solution acétique de sel de Reinecke. On obtient un précipité abondant de reineckates d'alcaloïdes que l'on libère sous forme de chlorhydrates solubles dans l'eau.

Les solutions aqueuses alcaloïdiques sont évaporées à sec à basse température sous pression réduite. Le résidu est repris par le méthanol et constitue la *fraction B*.

L'étude de ces deux fractions a été effectuée par chromatographie en couche mince et chromatographie sur papier.

2) SEPARATION DES ALCALOIDES PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE, ET CARACTERISATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

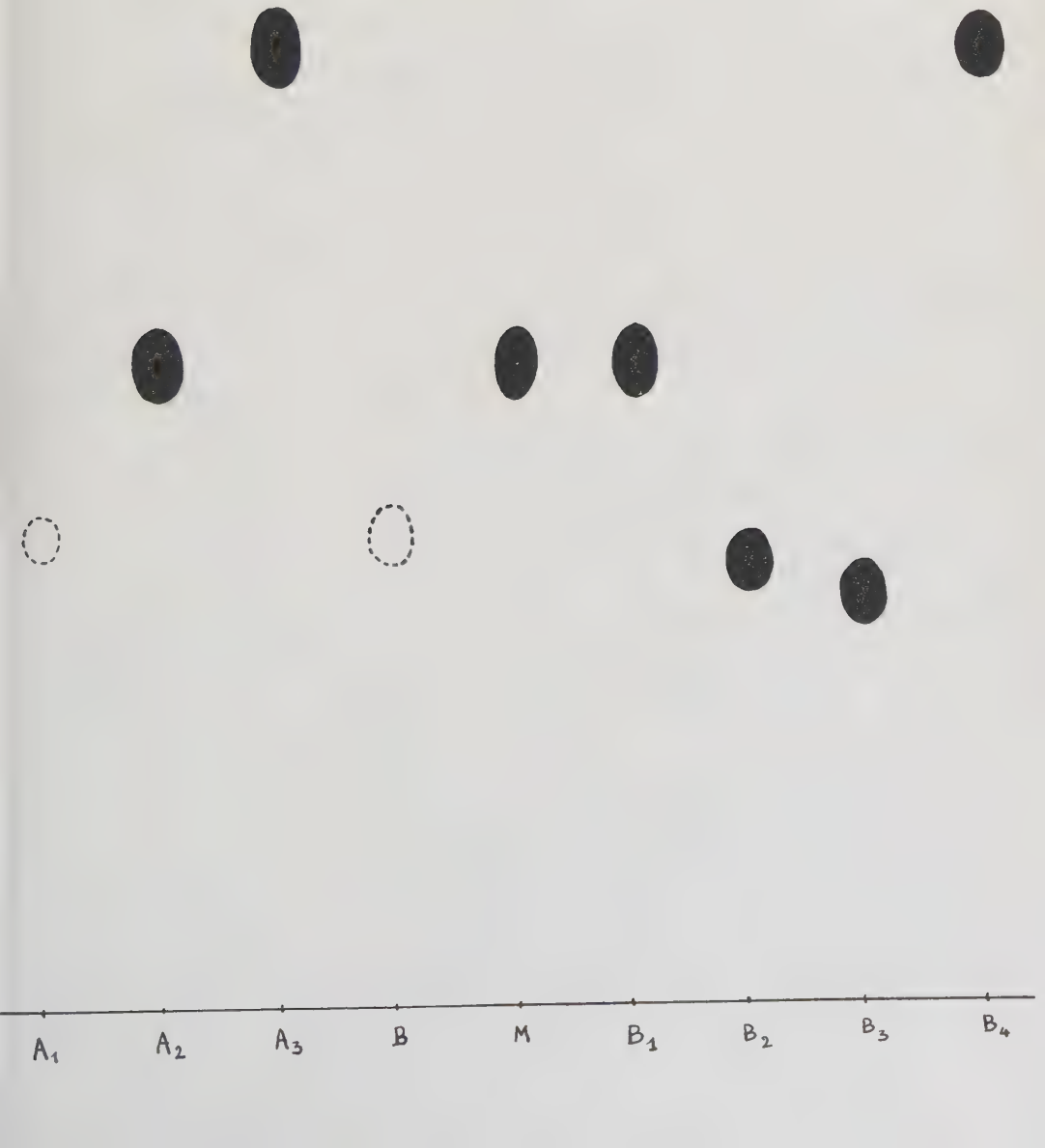
Les fractions A et B sont chromatographiées en bandes sur des plaques de gel de silice G de 1,5 mm d'épaisseur.

Nous utilisons comme solvant le B.A.E. (35-5-1).

PLANCHE X

AQUILEGIA PYRENAICA :

Chromatographie sur papier dans le B.A.E.



Après examen aux ultra-violets et révélation d'une faible partie latérale du chromatogramme avec du réactif de Dragendorff, on recueille les bandes ayant réagi positivement.

Le gel de silice est récupéré puis élué avec du méthanol.

Les divers éluats sont concentrés sous vide, et étudiés par chromatographie, sur papier Whatman n° 1, dans trois solvants différents : B.A.E. (pl. X), P.E.E., P.A.E.

Les résultats obtenus sont les suivants : (voir tableau).

	B.A.E.	P.E.E.	P.A.E.	FLUORESCENCE
Fraction A = 3 taches				
N° 1	Rf=0.40	Rf=0.31	Rf=0.60	Jaune intense
N° 2	Rf=0.55	Rf=0.24	Rf=0.56	Bleue
N° 3	Rf=0.82	Rf=0.54	Rf=0.85	Pas de fluo rescence
Berbérine témoin	Rf=0.40	Rf=0.31	Rf=0.60	Jaune intense
Magnoflorine	Rf=0.55	Rf=0.24	Rf=0.56	Bleue
Fraction B = 4 taches				
N° 1	Rf=0.55	Rf=0.24	Rf=0.56	Bleue
N° 2	Rf=0.38	Rf=0.68	Rf=0.39	Bleu vert
N° 3	Rf=0.35	Rf=0.72	Rf=0.32	Violet foncé
N° 4	Rf=0.82	Rf=0.54	Rf=0.85	Pas de fluo-rescence

Conclusion : Nous avons donc révélé l'existence de trois alcaloïdes qui ont respectivement le comportement chromatographique de :

- la *berbérine*
- l'*aquiléginine*
- la *magnoflorine*

Nous avons de même mis en évidence *deux autres corps à réaction alcaloïdique de Rf :*

= 0.68 et 0.72 dans le P.E.E.,

= à 0.39 et 0.32 dans le P.A.E.,

= à 0.38 et 0.35 dans le B.A.E.

que nous n'avons pu identifier.

CONCLUSIONS

Les deux Ancolies étudiées ont en commun trois alcaloïdes : berbérine, aquiléginine, magnoflorine.

Ces alcaloïdes sont, dans les deux espèces, à des concentrations différentes:

Si la magnoflorine est,dans les deux cas,l'alcaloïde majeur,l'aquiléginine domine dans *Aquilegia pyrenaïca*, alors que la berbérine y est seulement à l'état de traces, inversement dans *Aquilegia nemoralis*,la berbérine est plus abondante que l'aquiléginine.

Quant aux alcaloïdes non identifiés, l'examen des Rf montre de toute évidence qu'ils ne sont pas les mêmes dans les deux plantes.

Les travaux de WINEK et Coll ont mis en évidence, sur les dix espèces américaines qu'ils ont étudié , la présence constante d'aquiléginine, berbérine, et magnoflorine.

Ces trois alcaloïdes pourraient donc être caractéristiques du genre Aquilegia.

Les deux espèces étudiées se différencieraient, par contre, par l'existence d'alcaloïdes spécifiques dont les Rf sont les suivants :

- dans le P.A.E. : Aquilegia nemoralis 0.60 et 0.85
  Aquilegia pyrenaïca 0.39 et 0.32

- dans le P.E.E. : Aquilegia nemoralis 0.30 et 0.84
  Aquilegia pyrenaïca 0.68 et 0.72
- dans le B.A.E. : Aquilegia nemoralis 0.24 et 0.69
  Aquilegia pyrenaïca 0.38 et 0.35

Nous en concluons qu'aucune identité ne peut être établie entre ces différentes substances qui semblent chacune caractéristique de l'espèce d'Ancolie dans laquelle on les rencontre.

Nous avons essayé, avec la faible quantité de préparation dont nous disposions, d'étudier les effets des extraits d'*Aquilegia nemoralis* sur l'animal. Ces essais ont porté sur la souris et sur le rat.

Les extraits secs préparés avec la teinture et avec l'alcoolature présentaient les caractéristiques suivantes :

- 1 g d'extrait sec de teinture correspond à 1,5 g de poudre de racine sèche, représentant 15 à 20% du poids de racine fraiche,
- 1 g d'extrait sec d'alcoolature correspond à 10 g de racine fraîche.

La teneur en alcaloïdes totaux est environ 0,8 à 1% du poids de plante sèche.

Ces extraits secs ont été mis en solution à 10% dans du sérum physiologique ; après 24 h, la solution a été filtrée sur verre fritté. Le pH de ces préparations étant trop bas (5,3 et 5,0) pour pouvoir les administrer à l'animal, nous avons ajouté une quantité suffisante de NaOH à 1% jusqu'à pH 6, pH auquel aucune précipitation n'a été notée après 24 h.

Nous avons étudié comparativement les effets toxiques déterminés par ces deux préparations et, afin de simplifier la description de la symptomatologie, nous

les avons désignés par :

A : solution préparée avec l'extrait sec de teinture,

B : solution préparée avec l'extrait sec d'alcoolature.

Le pH de ces préparations étant encore très faible, tous nos essais ont été recoupés par des essais témoins, réalisés dans les mêmes conditions expérimentales, avec du sérum physiologique amené à pH 6 avec HCl 1%.

TROISIEME PARTIE

ESSAIS TOXICOLOGIQUES ET PHARMACODYNAMIQUES

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DE LA TOXICITE IMMEDIATE ET DIFFEREE

1) A L'EGARD DE LA SOURIS

Tous nos essais ont été réalisés sur des lots de souris, constitués par 4 mâles et 4 femelles non gestantes ; ces souris blanches (Mus Musculus, variété albinos, souche Swiss), âgées de 4 à 5 semaines, pesaient de 21 à 26 g.

La solution, portée au préalable à la température de 38°, était administrée lentement.

Les animaux ont ensuite été soigneusement examinés, afin de noter les effets immédiats de l'agressivité. Les sujets survivant à l'épreuve ont été pesés deux fois par semaine.

Des examens anatomopathologiques ont été pratiqués sur des sujets sacrifiés à échéances comprises entre 24 h et 10 jours.

a - Essais par voie I.P :

Les essais préliminaires exécutés avec une solution, dans du sérum physiologique, d'extrait sec total de teinture, non filtrée et non tamponnée, nous ont conduit à évaluer la DL 50 en 24 h à environ 4,30g de racine fraiche par Kg d'animal.

Les essais définitifs exécutés avec la solution filtrée ramenée à un pH de 6,0 (solution A) ont conduit aux observations suivantes.

Des doses uniques aussi élevées que 24 ml/kg

de solution, correspondant à3,6g de poudre sèche, et 24 g de racine fraiche, ne sont pas mortelles pour l'animal.

La symptomatologie de l'intoxication se caractérise précocement, dès la dose de 1 ml/kg (soit environ 0,025 ml par sujet). : l'animal crie dès qu'on le touche ; il ne semble pas que ce signe de souffrance corresponde à une douleur localisée, puisque des sujets éprouvés par voie p.o et i.v. présentent la même réaction. Il semble plutôt qu'il s'agisse d'une réaction de frayeur, l'animal est affolé, agressif, cherche à fuir, ses yeux sont exorbités, il cherche à mordre. Les animaux groupés se battent entre eux, même les femelles. Le catatonus de la queue est fréquent, mais bref. A cette phase d'excitation intense, sans convulsion , succède, 10 min (A) à 20 min (B) après l'injection, une phase de repos, sans apathie.

Le comportement de l'animal est redevenu normal après 30 min environ.

Aux doses croissantes et atteignant 10ml/kg, la symptomatologie est comparable ; il faut atteindre la dose de 12 ml/kg, soit 1,8 g de poudre sèche, ou 12 g de racine fraiche, pour qu'on observe une réactivité différente de l'animal à l'intoxication par les préparations A et B : tandis que l'injection de la solution A conduit à des réactions d'excitation spon-

tanée comparables à celles observées aux doses inférieures, l'injection de la solution B immobilise l'animal qui reste blotti dans un coin de sa cage, tout en restant très réactif au bruit et au toucher. Cette phase dure 10 à 20 min, puis l'animal devient agressif, prêt à bondir. Ces symptômes sévères s'accentuent aux doses supérieures (24 ml/kg) soit environ 0,50 ml par animal, dose cependant non mortelle, quelle que soit la durée de l'observation. La récupération du comportement normal est toujours plus lente après épreuve à la préparation B.

Nous avons éprouvé quelques sujets à des doses très supérieures ; à la dose de 50 ml/kg, le catatonus de la queue est plus fréquent, surtout avec la solution A qui provoque même quelques convulsions, avec phase clonique très discrète, ou parfois même inexistante : et brève phase tonique ; 50 % des sujets succombent après 10 min environ, mais jamais pendant la phase convulsive. Les survivants récupèrent en moins de 30 min. A cette dose élevée les sujets traités à la préparation B ne meurent pas, ils récupèrent en 1 à 2 h.

Après épreuve, quelles que soient les doses administrées, on note après la phase d'excitation, quand l'animal a récupéré son habitus normal, un léger mais constant élargissement de la fente palpébrale. Il n'y a pas lacrymation, ni mydriase, ni myosis, pas de piloérection.

L'observation pendant 10 à 20 jours de tous

sujets éprouvés, n'a pas mis en évidence de modification de la courbe pondérale ; après 24 h et 48 h le poids de l'animal était comparable à celui des sujets témoins.

La température rectale n'a pas été perturbée.

L'urine et les selles sont apparamment normales.

b - Essais par voie endoveineuse :

Des essais préliminaires nous ont conduit à reconnaitre que l'agressivité des préparations A et B est plus sévère par voie I.V., que par voie I.P.

Nous avons déterminé la dose maximale jamais mortelle (DMJM) et la dose minimale toujours mortelle (DmTM) des préparations A et B, et l'échéance (temps de crise), très réduite, après laquelle quelques sujets éprouvés à des doses intermédiaires, récupéraient complètement : après 20 min (sol.A),et 30 min (sol. B), la survie est assurée. L'observation pendant 20 jours des animaux survivants n'a pas permis de noter un seul exitus.

Nous avons, avant d'entreprendre les essais définitifs, administré à une série de 10 mâles et 10 femelles un volume de sérum physiologique acidifié à pH 6 par de l'acide chlorhydrique à 1%, correspondant au volume maximal injecté (15 ml/kg, soit environ 0,40 ml par animal), afin de nous assurer que la mort n'était pas déterminée par un choc par surcharge ou par apport de

solution d'un pH nettement plus faible que celui du plasma sanguin. Aucun sujet ainsi éprouvé n'a succombé.

Cinq doses, comprises entre la DMJM et la DmTM déterminées par les essais préliminaires, choisies équidistantes suivant l'échelle logarithmique à base 10, ont été administrées à des séries de 8 sujets (4 mâles et 4 femelles) ; la dose léthale 50 à échéance du temps de crise (DL 50 % LIMITE) a été calculée par la méthode des probits (5) adaptée par MOULAS (15) aux épreuves de toxicité.

Les caractéristiques numériques de la toxicité des préparations A et B sont notées dans le tableau ci-après :

La symptomatologie de l'intoxication est très voisine de celle observée après épreuve par voie i.p. : aux doses non mortelles, réaction vive à la préhension, surtout chez les sujets du groupe A qui, aux doses croissantes, présentent une intense hyperactivité spontanée ; les sujets du groupe B s'immobilisent en décubitus ventral aux doses mortelles pendant 1 à 2 min, mais sont très excitables, et dès qu'ils se redressent deviennent spontanément agressifs. Le catatonus apparaît parfois ; les crises convulsives sont fréquentes mais peu sévères. On ne note pas de signe oculaire , pas de piloérection.

TOXICITE DES PREPARATIONS D'AQUILEGIA NEMORALIS SOURIS i.v.

	Solution injectée (A) ml/Kg	DOSES EXPRIMEES		Solution injectée (B) ml/Kg	DOSES EXPRIMEES	
		en extrait sec de teinture g/Kg	en plante sèche g/Kg		en extrait sec d'alcoolature g/Kg	en plante fraîche g/Kg
Temps de crise	20 min.	-	-	30 min.	-	-
DMJM	8,0	0,8	1,2	5,7	0,6	5,7
DL 50 au temps de crise et limites de confiance (probabilité de 95%)	11,6 (10,7 -12,7)	1,2	1,7	8,1 (7,4 - 9,0)	0,8	8,1
Dm TM	14,7	1,5	2,2	10,4	1,0	10,4

La température centrale prise à la sonde rectale toutes les 15 min pendant les 2 heures suivant l'administration des doses maximales jamais mortelles et 50% mortellesn'est pratiquement pas modifiée.

Un cas (dose de 8ml/Kg de la préparation A) d'hématurie ayant été noté, la recherche du sang (méthode au pyramidon) a été effectuée dans les urines émises par des séries de 5 sujets groupés dans des cages à métabolisme, pendant 24 h (doses de 6,0 ; 8,0 ; et 10,0 par voie i. v. des préparations A et B). Cette recherche a été négative, la diurèse était normale. Les Les selles étaient normales.

c - Essais par voie per-orale :

Quelques sujets seulement ont été éprouvés par voie p.o. à la sonde oesophagienne. Les doses de 4 et 8 ml/Kg ne sont pas mortelles ; la symptomatologie paraît identique à celle notée après intoxication par voie i.p. mais les premiers signes n'apparaissent qu'après 10 min. La rareté de la matière première ne nous a pas permis de poursuivre ces essais.

2) A L'EGARD DU RAT

Les essais n'ont pas été ystématiques en raison de la trop faible quantité de drogue dont nous disposions. Nous avons administré à des rats blancs souche Wistar AG (5 mâles et 5 femelles non gestantes de 200 à 210 g) la dose de 8 ml/kg, correspondant aux solutions A et B, soit un volume de 1,6 ml par sujet. Aucun animal n'a succombé. A cette dose, la différence de réactivité à l'intoxication par les préparations A et B est très nette, beaucoup plus nette que chez les souris : hypersensibilité et agressivité spontanées dès l'injection de la préparation A ; prostration mais réactivité agressive au toucher après intoxication par la préparation B. On ne note pas de signes oculaires, pas de piloérection.

EXAMENS ANATOMOPATHOLOGIQUES

Les pricipaux organes (foie, reins, poumons, pancréas, testicules, rate) des souris et rats sacrifiés à des échéances de 24 h, 2j ; 4j ; 8j ; 12j, après épreuve aux préparations injectées par voie i.p. et i.v. (4 sujets par dose) ont été soumis à un examen anatomopathologique.

Les animaux ayant succombé à de fortes doses de solution d'extrait total non filtrée présentaient des

poumons hemorragiques ; par contre aucune lésion microscopique n'a été notée après administration des préparations A et B. Les sujets traités par voie i.p. ne présentaient aucune irritation péritonéale particulière.

CHAPITRE DEUX

ESSAIS PHARMACODYNAMIQUES PRELIMINAIRES

Les essais ont été pratiqués sur le rat blanc mâle (Rattus norvegicus Berkenhout, albinos) de souche Wistar AG, pesant 300 g environ, anesthésié à l'urethane (1, 25g par Kg d'une solution à 50% dans du serum physiologique, voie i.p.). Après 2 heures, les animaux ont été sacrifiés.

La pression centrale a été enregistrée à l'artère carotide, au manomètre à mercure de Condon. Les variations de la pression endotrachéale ont été enregistrées par l'intermédiaire d'un tambour de Marey.

Les injections des préparations A et B, préalablement portées au bain marie à la température de 39°, ont été faites dans la veine du pénis.

Quelques essais préliminaires nous ont conduit à observer que l'injection d'un volume réduit, 0,2 ml par animal, déterminait une hypotension brève et discrète, bientôt suivie d'une légère hypertension prolongée ; les effets étaient plus nets après injection de la solution B. Nous avons systhématiquement adopté la dose de 0,6 ml par animal, (soit environ 2ml/Kg) injectée lentement (5min) et examiné les effets cardiovasculaires et respiratoires.

En cours d'injection, on note une chute tensionnelle assez rapide, plus accusée avec la solution B, parfois presque inexistante avec la solution A, suivie d'un palier. Après 5 à 10 min la tension s'élève progres-

sivement jusqu'à atteindre, après 90 min, une valeur de 30 à 40% supérieure à la valeur tensionnelle primitive, chez la plupart des sujets (6 sujets sur 8 voir graphique : pl. XI) ; l'élévation tensionnelle chez un sujet du groupe A et un sujet du groupe B n'était que 15 et 20%.

Le pouls, compté sur électrocardiogramme, inchangé (A) ou légèrement abaissé (B) au cours de l'injection, s'accélère pendant 90 min environ, puis ralentit progressivement. Cette élévation importante (cf tabl) du rythme cardiaque a été notée chez tous les sujets du groupe B, même chez l'animal dont la valeur tensionnelle ne s'est que peu élevée. Le tracé de l'électrocardiogramme n'est pas altéré.

Pendant toute la durée de l'observation, l'animal reste calme.

L'un des sujets a succombé après 2 h 45 (sol. A , une demi dose d'urethane de rappel avait été administrée après 2 h) ; la mort n'a été précédée d'aucune agitation. Tous les autres sujets étaient vivants à la fin de l'épreuve. (2 heures).

L'excitation du vague périphérique et l'injection i.v. d'acétylcholine à dose muscarinique, pratiquées avant et après l'injection des solutions A ou B, conduisent aux mêmes effets tensionnels caractéristiques de l'excitation du parasympathique.

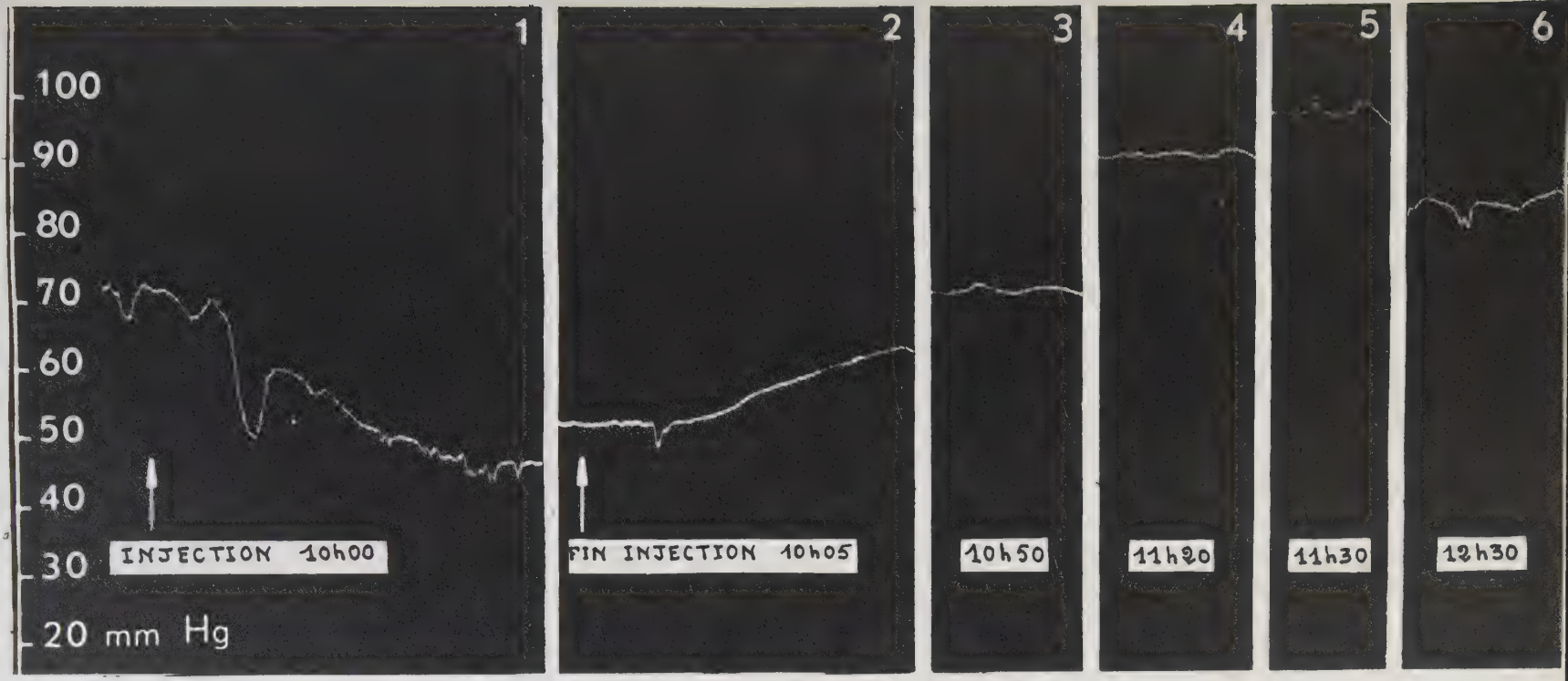


PLANCHE XI

Rat uréthanisé - Pression artérielle centrale

AQUILEGIA NEMORALIS , Extrait A : 0,50 ml

L'injection i.v. de propranolol (100mg/Kg) réduit le rythme cardiaque pendant une heure environ, la fréquence minimale étant notée après 30 min (chute de 18 à 23% du rythme initial). L'administration de solution A ou B, 5min après l'administration de propanolol ne détermine plus d'accélération du rythme cardiaque pendant 30 à 40 min. Après cette échéance le pouls a tendance à s'accélérer. L'injection d'une dose supplémentaire de propanolol (50 mg/kg), administrée 30 min après la première, stabilise le rythme cardiaque. L'élévation tensionnelle est réduite, mais jamais complètement supprimée. La yohimbine, administrée seule, réduit l'augmentation de la tension centrale ; elle la diminue davantage associée au propanolol, mais ne la supprime en aucun cas.

CONCLUSION

Ces essais, très fragmentaires, en raison de la faible quantité de matière première dont nous disposions, ne peuvent pas nous permettre de préciser les effets pharmacodynamiques de ces colatures.

La symptomatologie de l'intoxication de la souris et du rat non anesthésiés, nous a permis de noter un effet excitant immédiat, mais fugace, effet excitant complétement inhibé après anesthésie à l'urethane. Les convulsions, lorsqu'elles apparaissent, ne sont jamais sévères.

TENSION CENTRALE ET POULS (RAT URETHANISE)

ECHEANCES	PREPARATION A (2 ml par Kg, soit 0,30 g de poudre sèche)				PREPARATION B (2 ml par Kg, soit 2 g de racine fraîche)			
	Tension artérielle.		Pouls		Tension artérielle.		Pouls	
	mmHg	Variation %	Puls/min	Variation %	mmHg	Variation%	Puls/min	Variation %
Avant l'injection	7,5	-	286	-	7,2	-	280	-
En fin d'injection	7,2	- 4 %	282	- 1%	6,7	- 7%	270	- 4 %
10 min après la fin de l'injection	7,3	- 3 %	290	+ 1 %	7,2	0%	290	+ 4 %
30 min " " "	7,4	- 2 %	300	+ 5 %	7,6	+ 6%	300	+ 7 %
60 min " " "	8,8	+ 17%	312	+ 9 %	8,5	+ 18%	354	+ 26%
90 min " " "	9,9	+ 32%	324	+ 13%	9,5	+ 32%	408	+ 44%
105 min " " "	9,0	+ 20%	312	+ 9 %	9,0	+ 28%	395	+ 41%
120 min " " "	8,0	+ 11%	300	+ 5 %	8,3	+ 14%	384	+ 37%

L'élargissement de la fente palpebrale, observé 30 min après injection i.p. surtout, laisse présager un effet sympathomimétique β, les effets d'excitation α n'apparaissant pas (pas de mydriase, pas de piloérection).

Les effets cardiovasculaires sont beaucoup plus tardifs(au moins chez l'animal urethanisé). L'accélération cardiaque n'est pas consécutive à une perturbation d'origine vagale, mais serait plutôt la conséquence d'une excitation sympathique β.

L'élévation tensionnelle semble être déterminée, en partie, par l'augmentation du rendement cardiaque, et en faible partie par une excitation des récepteurs α.

L'activité sympathique semble donc être exaltée dans son ensemble.

Nous reprendrons cette étude sur animaux entiers, et également sur organes isolés, dès que la nouvelle récolte sera engagée.

CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de l'étude botanique, *chimique et pharmacologique d'Aquilegia nemoralis* et celle, plus succinte, de *Aquilegia pyrenaica* nous avons résumé, à la fin de chaque chapitre, les conclusions essentielles. Cependant il nous semble intéressant de souligner les quelques points suivants :

L'étude botanique de *Aquilegia nemoralis* et *Aquilegia pyrenaica* nous a permis de confirmer la position systématique de ces espèces. Nous avons de plus abordé et approfondi la morphologie interne des parties souterraines de ces deux plantes, négligée jusqu'alors.

Dans notre étude chimique, limitée aux alcaloïdes, nous nous sommes attachés à les séparer, purifier et caractériser par des méthodes simples. Nous avons pu isoler à l'état cristallisé l'*aquiléginie*, la *berbérine*, la *magnoflorine*.

Ces trois alcaloïdes semblent présents dans toutes les espèces d'Aquilegia. De plus, dans chacune des Ancolies étudiées existent *deux alcaloïdes spécifiques* que nous n'avons pu identifier en raison de leur faible concentration.

Des études pharmacodynamique préliminaires ont été effectuées sur le rat et sur la souris.

Ces préparations semblent exalter l'activité sympathique dans son ensemble.

BIBLIOGRAPHIE

1 - BORDERES O.
Documents pour la carte des productions végétales
Série Pyrénées, Volume III, n° 11.

2 - CAZIN F.
Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes et acclimatées, (1886).

3 - DRAGENDORFF G.
Die heilpflanzen den verschiedenen Volker und Zeiten.
Stuttgart 1898.

4 - FETTE SEIFEN.
Etude des huiles des graines d'Aquilegia vulgaris.,
Austrich Mittel 1965, 67, n° 1, p. 14.

5 - FINNEY V.D.J.
Statistical method in biological assay.
Ch. Griffin, London 1952.

6 - FOKIN S. J.
russ. phys. chem. Ges. 1903 . 35 . 831 . 835.
(d'après Chem Centralbl, 1903, II, 1451)

7 - FOURNIER P.
Les quatre flores de France 1940, p 340.

8 - HOGG R. BEAL J.L. CAVA M.P.
A study of the Alkaloids of Thalictrum. I.
Isolation of some quaternary alkaloids from.
Thalictrum dasycarpum var. hypoglaucum.
Lloydia 1961. Vol. 24. n° 1 - p. 45.

9 - JANOT M. et LEHIR R.
Chromatographie en chimie organique et biologique
E. Lederer. 1959. Vol I. p 505 - 509.

10- JORISSEN A. J.
Pharm. Chim. 1885, 5°s, 11, 286 - 287.

11 - JORISSEN A. HAIRS E.
J. Pharm. Anvers, 1891, 47, 285 - 292

12- KELLER A.
Arch. der Pharm, 1910, 248 ; 463 - 467.

13- KUHN A. SCHAFER G.
Madaus Jahresber, 1939 (1940), 3, 52-58.

14- MANSKE R H. F. AND HOLMES H. L.
The Alcaloïds ; Academic Press Inc.

15 - MOULAS F.
Sur les méthodes statistiques d'estimation de la DL 50.
Thèse Dr. Spec. Math. Appl. (Statis. Math.)
Toulouse 1964.

16 - MUNIER R.
Bull. Soc. Chim. Biol. 35 ; 29 ; 1952.

17 - MUNZ P. A.
Gentes herbarum, 1946, Volume VII, Fascicule 1.

18 - PANOUSE J.
Bull. Soc. Chim de France, 1949, p 594 à 598.

19 - RANDERATH K.
Chromatographie sur couches minces.
Gauthier - Villars. Paris 1964.

20 - REUTTER L.
Traité de matière Médicale et de Chimie Végétale. J.B. Baillière et Fils, Paris 1923

21 - ROCHEBRUNE
(A.T de) Toxicologie Africaine, (1897. VOl I)
chap. I

22 - STASS. OTTO. OGIER
Précis de toxicologie
R. Fabre et R. Truhaut. Tome II.

23 - STHAL E.
Thin-Layer chromatography. Pharmazie 1956, II, 633 - 637.

24 - STAHL E.
Thin-Layer chromatography Z. anal. chem. 1961, 181, 303, 312.

25 - VALSER
L'officine, Répertoire Général de pharmacie pratique
Dorvault Vigot frères - PARIS - 1945.

26 - VANDERLINDEN E.
Rec. Inst. Bot. 1902, 5, 135 - 178.

27 - VAN DE VEN A.J.
Over het cyaanwaterstofzuur bij de Prunaceae
Diss. Inaug., Dordrecht, 1898.

28 - WINEK Ch. L.
A chemical study of the alkaloïds of Aquilegia.
Dissert ; Abst. 1963, n° 1, Vol 24, p : 88.

29 - WINEK Ch. L. BEAL J.L., CAVA P.P.
The alkaloïds of Aquilegia hybrida "Scott-Elliot". Lloydia 1964, Vol. 27, n°2, p : 111.

30 - WINEK Ch. L., BEAL J.L. CAVA M.P.
Comparative chromatography identification of the alkaloïds of ten Aquilegia species. Journal of Pharmaceutical Sciences, July 1964, Vol 53, n°7, p : 734 - 737.

TABLE DES MATIERES

AVANT - PROPOS

PLAN

ETUDE BOTANIQUE..... 1

POSITION SYSTEMATIQUE..... 3

I - ETUDE DE AQUILEGIA NEMORALIS (J)..... 7

Répartition et habitat..... 9

Morphologie externe..... 9

Anatomie..... 10

II - ETUDE DE AQUILEGIA PYRENAICA (DC)... 15

Répartition et habitat..... 17

Morphologie externe..... 17

Anatomie..... 18

CONCLUSIONS..... 21

RECHERCHE DES ALCALOIDES..... 23

TRAVAUX ANTERIEURS..... 23

I - ETUDE DES ALCALOIDES DE AQUILEGIA NEMORALIS..... 25
1°) Choix et préparation du matériel.. 29
2°) Obtention de l'extrait alcaloïdique..... 29
Méthode de la Pharmacopée de Genève..... 29
Lixiviation..... 31
3°) Purification de l'extrait alcaloïdique..... 32
Procédé de Stass..... 32
Méthode des reineckates..... 33
4°) Fragmentation des blocs alcaloïdiques A et B..... 36
Chromatographie sur papier..... 36
Chromatographie sur colonne..... 38
Chromatographie sur couche mince..... 42
Obtention des alcaloïdes à l'état cristallisé..... 45
5°) Identification des alcaloïdes cristallisés..... 46
Chromatographie sur papier..... 46
Spectrographie en U.V. et I.R. ... 48
Conclusions..... 50

II - ETUDE DES ALCALOIDES DE AQUILEGIA PYRENAICA (DC)..... 53
1°) Obtention de l'extrait alcaloïdique et purification..... 55
2°) Séparation des alcaloïdes par chromatographie sur couche mince et caractérisation par chromatographie sur papier..... 56
3°) Conclusions..... 58

CONCLUSIONS..... 59

ESSAIS TOXICOLOGIQUES ET PHARMACODYNAMIQUES.... 63

I - ETUDE DE LA TOXICITE IMMEDIATE ET DIFFEREE..... 65
1°) A l'égard de la souris..... 67
Essais par voie i.p. 67
Essais par voie endoveineuse..... 70
Essais par voie per-orale..... 73
2°) A l'égard du rat..... 74
Examens anatomopathologiques..... 74

II - ESSAIS PHARMACODYNAMIQUES PRELIMINAIRES 77

CONCLUSIONS..... 81

CONCLUSIONS GENERALES..... 85

BIBLIOGRAPHIE..... 87

Vu : le Président de Thèse

E. STANISLAS

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Toulouse, le 8 février 1971

Le Président du Conseil de
l'Université PAUL-SABATIER

LARENG